

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

15 June 2000 (15.06.00)

International application No.:

PCT/JP99/06873

Applicant's or agent's file reference:

2576WO0P

International filing date:

08 December 1999 (08.12.99)

Priority date:

09 December 1998 (09.12.98)

Applicant:

ITO, Takashi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

24 January 2000 (24.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

BEST AVAILABLE COPY

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT

特許協

約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/19, C12P 21/02, C07K 14/52, A61K 38/19</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/34478</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月15日(15.06.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06873</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月8日(08.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/350377 1998年12月9日(09.12.98) 特願平11/55326 1999年3月3日(03.03.99)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 伊藤隆司(ITO, Takashi)(JP/JP) 〒658-0032 兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番地 101-2003号 Hyogo, (JP) 近藤光代(KONDO, Mitsuyo)(JP/JP) 〒565-0823 大阪府吹田市津雲台5丁目18番D73-103号 Osaka, (JP) 田中葉子(TANAKA, Yoko)(JP/JP) 〒610-0331 京都府京田辺市田辺勇田80-50 Kyoto, (JP) 小林昌行(KOBAYASHI, Masayuki)(JP/JP) 〒666-0261 兵庫県川辺郡猪名川町松尾台2丁目1番地12 (E502) Hyogo, (JP)</p>	<p>五十嵐貢一(IGARASHI, Koichi)(JP/JP) 〒606-0802 京都府京都市左京区下鴨宮崎町66番地の3 Kyoto, (JP) 佐々田玲子(SASADA, Reiko)(JP/JP) 〒617-0824 京都府長岡京市天神4丁目6番8号 Kyoto, (JP) 西村 紀(NISHIMURA, Osamu)(JP/JP) 〒305-0812 茨城県つくば市大字東平塚586番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: BETACELLULIN MODIFICATION</p> <p>(54)発明の名称 ベータセルリン改変体</p> <p>(57) Abstract A betacellulin mutein or its salt which exerts a reduced EGF activity while sustaining the BTC activity. Because of being free from the problem of antigenicity, it is useful as an excellent remedy for diabetes.</p>		

(57)要約

本発明のベータセルリンムテインまたはその塩は、BTC活性が保持されたまま、EGF活性が低減されており、抗原性の問題もないことから、優れた糖尿病治療薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LJ	セントシユタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GD	グレナダ	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GE	グルジア	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルkina・ファソ	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TS	ツェナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CI	コートジボアール	IN	インド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

ベータセルリン改変体

5 技術分野

本発明はベータセルリン（BTC）の膵臓β細胞への分化促進活性（BTC活性）を保持したまま平滑筋細胞等の上皮細胞の増殖促進活性（EGF活性）を低減させたムテイン（以下、改変体または改変分子と称することもある）及びその製造法などに関する。

10

背景技術

ヒトベータセルリンは、178アミノ酸からなる前駆体より切り出された80アミノ酸からなる蛋白性因子でその全アミノ酸配列が明らかにされている

15 [Sasada ら；バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Biochem. Biophys. Res. Commun.），190：1173（1993）]。

生体内に存在するベータセルリンは極めて微量で、これを取得するのは困難であったが、遺伝子組換え技術を用いた製造法が特開平6-87894号公報などに記載されている。ベータセルリンは当初マウス3T3細胞に対する増殖促進活性を持つ因子として見出されたが、その後、血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞に
20 対しても増殖促進活性（EGF活性）を有することが明らかとなった[Shing ら；サイエンス（Science），259：1604（1993）]。さらに、ベータセルリンは膵臓未分化肝細胞に作用して、インシュリンを産生する膵臓β細胞への分化を促進する作用（BTC活性）を有する[Mashima ら；ジャーナル オブ クリニカル インビスティゲーション（J. Clin. Invest.），97：1647（1996）]
25 ことより、糖尿病（例えば、インスリン依存性糖尿病）、糖尿病における膵臓機能障害などの予防・治療剤として有用であるものと考えられる

[Miyagawa ら、1997年日本糖尿病学会 講演要旨集、125]。

しかしながらベータセルリンは前述のような血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞に対する増殖促進活性を併せ持つため、糖尿病治療剤として応用する場合には

これらの増殖活性が問題である。

そのため膵臓β細胞への分化促進作用を維持したまま、血管平滑筋細胞等に対する増殖促進活性を低減することが可能であるならば、より医薬品としての可能性を高めることができるが、これまでそのようなベータセルリン改変体について

5 は知られていない。

発明の開示

本発明者らはベータセルリンの改変体について種々の検討を重ねた結果、ベータセルリンの改変により膵臓β細胞への分化促進活性を保持したまま平滑筋細胞等の増殖促進活性を低減させることを可能たらしめるベータセルリン改変体であ

10 って、生体内に投与した場合に抗原性の問題を生じない改変体を初めて見出し、さらに研究を続けた結果、本発明を完成させた。すなわち、本発明はベータセルリンの改変体及びその改変体を取得する方法などに関する。

すなわち、本発明は、

15 (1) 膵臓β細胞の分化促進活性が保持され、上皮細胞増殖促進活性が低減されたベータセルリンムテインまたはその塩；

(2) 上皮細胞増殖促進活性に対する膵臓β細胞の分化促進活性の比が、ベータセルリンのそれに比べて2倍以上である前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

20 (3) ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基L e uもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基A s pを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換された前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

25 (4) N末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失した前記(3)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(5) ①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：2で表されるアミノ酸配列または④配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN

末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を含有する前記(3)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(6) ①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：2で表されるアミノ酸配列、③配列番号：3で表されるアミノ酸配列または④配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有する前記(3)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(7) ①配列番号：37で表されるアミノ酸配列または②配列番号：38で表されるアミノ酸配列を含有する前記(3)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(8) ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入された前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(9) ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失した前記(8)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(10) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列を有する前記(8)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(11) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列を有する前記(8)記載のベータセルリンムテインまたはその塩；

(12) 前記(1)記載のベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ベータセルリンムテインを生成せしめることを特徴とする前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩の製造法；

(13) 前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩を含有してなる医薬組成物；

(14) 組成物が糖尿病予防・治療薬である前記(9)記載の医薬組成物；

(15) 前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とする糖尿病予防・治療法；

(16) 糖尿病予防・治療剤の製造のための前記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩の使用などに関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、77 残基型（C 末端 3 残基欠失型）ベータセルリン発現プラスミドの構築図を示す。

5 図 2 は、76 残基型（C 末端 4 残基欠失型）ベータセルリン発現プラスミドの構築図を示す。

図 3 は、実施例 7 で行われたベータセルリンムテインの電気泳動の結果を示す図を示す。

10 図 4 は、実施例 8 で行われた³H-チミジンの細胞への取り込み結果を示す図を示す。

図 5 は、実施例 9 に記載の β 細胞に分化した細胞に関する蛍光顕微鏡写真図を示す。

図 6 は、実施例 12 で行われた β 細胞分化促進活性の結果を示す図を示す。

15 図 7 は、2-76 残基型（N 末端 1 残基、C 末端 4 残基欠失型）ベータセルリンの発現プラスミドの構築図を示す。

図 8 は、24-76 残基型（N 末端 23 残基、C 末端 4 残基欠失型）ベータセルリンの発現プラスミドの構築図を示す。

図 9 は、実施例 19 で行われた泳動後のゲルの染色結果を示す図を示す。

20 図 10 は、参考例 1 に記載のプラスミド pTB1976 の構築の概略を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のベータセルリン改変体（ベータセルリンムテイン）は、上述のとおり、BTC 活性が保持されたまま、EGF 活性が低減あるいは減弱されている。

25 ここで、ベータセルリンとは、Sasada ら；バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Biochem. Biophys. Res. Commun.），190：1173（1993）に記載のとおり、Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp

Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr (配列番号 : 35) で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのことを意味する。

BTC活性が保持されたベータセルリウムテインとしては、ベータセルリンのBTC活性の20%以上、好ましくは50%以上の活性を有するベータセルリウムテインが挙げられる。

EGF活性が低減されたベータセルリウムテインとしては、ベータセルリンのEGF活性の約20%以下、好ましくは15%以下の活性を有するベータセルリウムテインが挙げられる。

BTC活性を保持したまま、EGF活性が低減された本発明のベータセルリウムテインとしては、上皮細胞増殖促進活性に対する膵臓 β 細胞の分化促進活性の比が、ベータセルリンのそれに比べて2倍以上であるベータセルリウムテインまたはその塩が好ましい。

BTC活性を保持したまま、EGF活性が低減された本発明のベータセルリウムテインとして具体的には、ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリウムテインまたはその塩などがあげられ、さらに具体的には、N末端から1ないし40個または1ないし20個のアミノ酸残基が欠失した前述のベータセルリウムテインなどがあげられる。

上記の「他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリウムテイン」中の他の「他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換」とは、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱された本発明のベータセルリウムテインの「BTC活性を保持したまま、EGFが減弱される」という特徴を損なわない範囲での置換であれば、特にアミノ酸残基またはペプチド鎖の種類は問わない。上記の「他のアミノ酸」の具体例として、非極性（疎水性）アミノ酸（例、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなど）、極性（中性）アミノ酸（例、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなど）、陽電荷をもつ（塩基性）

アミノ酸（例、アルギニン、リジン、ヒスチジンなど）、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸など）などがあげられる。上記の「他のペプチド鎖」の具体例としては、上記の「他のアミノ酸」が2個以上結合してなるペプチド鎖のことをいい、好ましくは2ないし4個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖などがあげられる。

「ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよくC末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン」の具体的な例としては、

(1) ベータセルリンのN末端から76番目までのアミノ酸配列 (Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基 (Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、例えば、

① Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val (配列番号：2) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

② Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp (配列番号：1) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテ

イン、

③ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg
Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala
5 Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg
Val Leu Phe Tyr (配列番号：5) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセル
リンムテイン、

④ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg
10 Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala
Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg
Val Leu Phe (配列番号：6) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン
ムテイン、

⑤ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
15 Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg
Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala
Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg
Val Leu (配列番号：7) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテ
イン、

⑥ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
20 Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg
Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala
Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg
Val Asp Phe Tyr (配列番号：8) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセル
25 リンムテイン、

⑦ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg
Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala
Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg

Val Asp Phe (配列番号：9) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、および

⑧ ベータセルリンのC末端から3番目のアミノ酸残基(L e u) が他のアミノ酸残基で置換されたベータセルリンムテインなどがあげられる。

- 5 なかでも、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインまたは配列番号：2 で表されるベータセルリンムテインが特に好ましい例としてあげられる。

(2) ベータセルリンのN末端から1ないし40番目までのアミノ酸残基(Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn
10 Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys) が欠失していてもよく、

N末端から41番目ないし76番目のアミノ酸配列(Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番
15 目のアミノ酸残基(Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基L e uもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基A s pを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、好ましくは、

(i) ベータセルリンのN末端から1ないし37番目までのアミノ酸残基(Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn
20 Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg) が欠失していてもよく、

N末端から38番目ないし76番目のアミノ酸配列(Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val
25 Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基(Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基L e uもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基A s pを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、

(ii) ベータセルリンのN末端から1番目のアミノ酸残基 (Asp) が欠失していてもよく、

N末端から2番目ないし76番目のアミノ酸配列 (Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基 (Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基 L e u もしくはC末端から4番目のアミノ酸残基 A s p を含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、

(iii) ベータセルリンのN末端から1ないし23番目のアミノ酸残基 (Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala) が欠失していてもよく、

N末端から24番目ないし76番目のアミノ酸配列 (Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基 (Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基 L e u もしくはC末端から4番目のアミノ酸残基 A s p を含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテインなどが挙げられ、

例えば、

① Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val (配列番号：4) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

② Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly

Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp (配列番号：3) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

③ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly
5 Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr (配列番号：10) で表され
るアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

④ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly
10 Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe (配列番号：11) で表されるア
ミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑤ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly
15 Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu (配列番号：12) で表されるアミノ
酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑥ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly
20 Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe Tyr (配列番号：13) で表され
るアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑦ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
25 Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly
Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe (配列番号：14) で表されるア
ミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑧ ベータセルリンのN末端から31ないし80番目のアミノ酸配列で表される
部分ペプチドにおいて、C末端から3番目のアミノ酸残基 (Leu) が他のアミノ
25 酸残基で置換されたベータセルリンムテイン、

⑨ Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pto Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg

Cys Glu Arg Val (配列番号：37) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、および

⑩ Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln
Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro
5 Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val (配列番号：
38) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインなどがあげられ
る。

なかでも、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：37または配列番号：38
で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインが好ましく、さらに好
10 ましくは、配列番号：37または配列番号：38で表されるアミノ酸配列を含有す
るベータセルリンムテインである。最も好ましくは配列番号：38で表されるアミ
ノ酸配列を含有するベータセルリンムテインである。

上記(1)、(2)に記載の本発明のベータセルリンムテインの好ましい例中、
特に好ましいものとしては、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：
15 1で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したア
ミノ酸配列、③配列番号：2で表されるアミノ酸配列、④配列番号：2で表される
アミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、⑤
配列番号：37で表されるアミノ酸配列または⑥配列番号：38で表されるアミ
ノ酸配列を含有するベータセルリンムテインである。

さらに好ましくは、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：2で
20 表されるアミノ酸配列、③配列番号：3で表されるアミノ酸配列、④配列番号：4
で表されるアミノ酸配列、⑤配列番号：37で表されるアミノ酸配列または⑥配列
番号：38で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインがあげられ
る。特に好ましくは配列番号：38で表されるアミノ酸配列を含有するベータセル
25 リンムテインである。

BTC活性を保持したまま、EGF活性が低減された本発明のベータセルリンム
テインとして具体的には、(1)ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミ
ノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番
目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセル

リンムテインまたはその塩、(2) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリンムテインまたはその塩なども挙げられる。

上記「アミノ酸残基が挿入されたベータセルリンムテイン(改変分子)」の「アミノ酸」の具体例としては、非極性(疎水性)アミノ酸(例、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなど)、極性(中性)アミノ酸(例、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなど)、陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸(例、アルギニン、リジン、ヒスチジンなど)、負電荷をもつ(酸性)アミノ酸(例、アスパラギン酸、グルタミン酸など)などがあげられる。アスパラギン、プロリン、セリンが好ましい。該「ペプチド鎖」としては、上記「アミノ酸」が2ないし5個結合してなるペプチド鎖のことをいい、好ましくは2ないし4個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖などがあげられる。

「N末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよいベータセルリン」としては、たとえば(1)上記配列番号：35で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、(2)N末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失したベータセルリン改変分子、(3)ベータセルリンのN末端の第1番目から第30番目のアミノ酸配列中にアミノ酸残基(例、1ないし5個のアミノ酸残基)が挿入されたベータセルリン改変分子などが含まれる。

該「N末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失したベータセルリン改変分子」には、(1)ベータセルリンのN末端側の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失したもの、(2)ベータセルリンのN末端側の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失し、アミノ酸残基(例、1ないし5個のアミノ酸残基)が付加したものなどが含まれる。

「ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基(すなわち、配列番号：35で表されるアミノ酸配列のN末端から第58番目のアミノ酸残基：Gln)と第23番目のアミノ酸残基(すなわち、配列番号：35で表されるアミノ酸配列のN末端から第59番目のアミノ酸残基：Thr)との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子」は、ベータセルリンのN末端の1ないし

30個のアミノ酸残基のどの部分のアミノ酸が欠失していてもよい、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子であればよく、具体例としては、

5 ① Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg
Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala
Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr (配列番号：46) で表されるアミノ酸配列を
10 含有するベータセルリン改変分子、

② ベータセルリンのN末端から1ないし30番目までのアミノ酸残基 (Asp Gly
Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn
Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys) が欠失していて、かつ
C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1な
15 いし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子、例えば、Arg Lys
Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys
Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly
Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr (配列番号：44) で
表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン改変分子などがあげられる。

20 本発明の「ベータセルリン改変分子」として、好ましくは、配列番号：44ま
たは配列番号：45で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン改変分子
などがあげられる。

25 本明細書におけるベータセルリンムテインはペプチド標記の慣例に従って左端
がN末端 (アミノ末端)、右端がC末端 (カルボキシル末端) である。またこれら
のベータセルリンムテインはC末端が通常カルボキシル基 ($-\text{COOH}$) またはカル
ボキシレート ($-\text{COO}^-$) であるが、C末端がアミド ($-\text{CONH}_2$) またはエ
ステル ($-\text{COOR}$) であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エ
チル、n-プロピル、イソプロピルまたはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シ

クロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

また、本発明のベータセルリンムテインにはN末端にMe t が付加したものも含まれる。

本発明のベータセルリンムテインの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のベータセルリンムテインは、例えば、特開平6-87894に記載の遺伝子工学的又はベータ腫瘍細胞の培養により得られたベータセルリンを自体公知のプロテアーゼ処理、好ましくはカルボキシペプチダーゼ処理さらに好ましくはウシ脾臓カルボキシペプチダーゼA処理することによっても調製する事が可能である。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ベータセルリンをヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のベータセルリンムテインを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱

離することにより目的のベータセルリンムテインを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

① M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④ 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ベータセルリンムテインのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のアミド体を取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種

活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObtなど）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メ

トキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBz、Cl₂-Bz、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチ

ジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

反応に関与すべきでない官能基への保護基の導入法およびその保護基の脱離法、反応に関与する官能基の活性化法などは、自体公知の方法またはそれに準じた方法に従って行えばよい。

また、ベータセルリンムテインのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

ベータセルリンムテインのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAとしては、（1）ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリン、（2）ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が

欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリンムテイン、(3)配列番号:45で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリンムテインをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。具体的には、本発明の配列番号:1ないし配列番号:14、配列番号37、配列番号38、配列番号:44、配列番号:45、配列番号:46で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインをコードする塩基配列を含有するものがあげられる。

より具体的には、(1)配列番号:1ないし配列番号:14で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインをコードするDNAとしては、配列番号:15ないし配列番号:28で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(2)配列番号37および配列番号38で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインをコードするDNAとしては、配列番号:42および配列番号:43で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(3)配列番号:47ないし配列番号:49で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(4)ストリンジェントな条件下で上記(1)ないし(3)で規定された配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(5)遺伝コードの縮重のため上記(1)ないし(4)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSである。

本発明のベータセルリンムテインを、ベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって製造する場合に用いられる本発明のベータセルリンムテインの発現ベクターは、例えば、(1)本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(2)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することによ

り製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、
5 ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、
10 レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、
15 SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。
20 選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ベータセルリンムテインのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル

5 配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α (MF α)・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたベータセルリンムテインをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

10 宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)], MM294 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 73巻, 4174(1976)] などが用いられる。

25 バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー

(Nature) , 315巻, 592(1985)]。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High FiveTM 細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィトロ (in Vitro) , 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO、DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr⁻CHO細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110(1972)、ジーン (Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻, 47-55頁 (1988年) などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法
〔Felgner, P. L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・
オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States of America), 84巻, 7413頁
5 (1987年)〕、リン酸カルシウム法〔Graham, F. L. and van der Eb, A. J.
ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁 (1973年)〕、電気穿
孔法〔Niemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.), 1巻, 841-84
5頁 (1982年)〕等が挙げられる。

10 このようにして、本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAを含有す
る発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明のベータセルリンムテインを安定に発現させる
方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた
細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカ
ーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカ
ーを用いて
15 得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のベ
ータセルリンムテイン等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができ
る。また、d h f r 遺伝子を選択マーカ―として用いた場合、MTX濃度を徐々に
上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明の
ベータセルリンムテインをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現
20 の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体を本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAが発
現可能な条件下で培養し、本発明のベータセルリンムテインを生成、蓄積せしめる
ことによって、本発明のベータセルリンムテインを製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に
25 使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に
必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たと
えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たと
えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、
肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては

たとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 50

1 (1952)), DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr 遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

上記培養物から本発明のベータセルリンムテインを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明のベータセルリンムテインを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にベータセルリンムテインが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の

差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のベータセルリンムテインが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、
5 逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のベータセルリンムテインを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ベータセルリンムテインを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、
10 トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

得られるベータセルリンムテインは、例えば、特開平10-191989号公報等に記載のリフォールディング工程に付してもよい。また、N末端にMe tが付加したベータセルリンムテインを特開平10-191989号公報等に記載のN末端のMe tの除去反応に付すことにより、N末端のMe tを除去することもできる。
15

かくして生成する本発明のベータセルリンムテインの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

20 本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAまたは本発明のベータセルリンムテインもしくはその塩は、糖尿病（例えば、インシュリン依存性糖尿病（I型糖尿病）など）、糖尿病における膵臓機能障害、老人性のインシュリン分泌低下に伴う膵臓機能低下症などの改善剤および未分化型膵臓ガンなど（特に糖尿病（例えば、インシュリン依存性糖尿病など）の予防・治療薬など）の医薬の開発に用いることができる。
25

さらに、本発明のベータセルリンムテインもしくはその塩またはそれをコードするDNAはEGF活性が減弱されていることおよび抗原性の問題がないことから、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のベータセルリンムテインもしくはその塩またはそれをコードするDNAは、糖尿病（例えば、インシュリン依存性糖

尿病)、糖尿病における膵臓機能障害、老人性のインシュリン分泌低下に伴う膵臓機能低下症などの改善剤および未分化型膵臓ガンなどの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

5 本発明のベータセルリンムテインもしくはその塩またはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用
10 できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、
15 コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂の
20 ような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤製造法にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)
25 などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール(たとえばエタノール)、ポリアルコール(たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のベータセルリンムテインもしくはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人の糖尿病患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 100 mg、好ましくは約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤として、成人の糖尿病患者（体重 60 kg として）に対し、一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	APMSF	: (p-アミジノフェニル) メタンスルホニルフルオリド塩酸塩
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	TFA	: トリフルオロ酢酸
5	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
10	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
15	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
20	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン
25	NMP	: N-メチルピロリドン

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Me : メチル基

Et : エチル基

- Bu : ブチル基
Ph : フェニル基
TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
Bom : ベンジルオキシメチル
5 PAM : フェニルアセトアミドメチル
Tos : p-トルエンスルフォニル
HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
Bzl : ベンジル基
Z : ベンジルオキシカルボニル基
10 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル基
Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル基
Boc : t-ブチルオキシカルボニル基
HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
15 TFA : トリフルオロ酢酸
Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル基
DNP : ジニトロフェニル基
Bum : ターシャリーブトキシメチル基
Trt : トリチル基

20

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のベータセルリンムテイン (BTC1-77) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

25 本発明のベータセルリンムテイン (BTC1-76) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

本発明のベータセルリンムテイン (BTC31-77) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

本発明のベータセルリンムテイン (BTC31-76) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 1－76、78－80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

5 本発明のベータセルリンムテイン（BTC 1－76、78、79）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 1－76、78）のアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：8〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 1－77、79、80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

15 本発明のベータセルリンムテイン（BTC 1－77、80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 31－76、78－80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

20 本発明のベータセルリンムテイン（BTC 31－76、78、79）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 31－76、78）のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：13〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 31－77、79、80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC 31－77、79）のアミノ酸配列を

示す。

〔配列番号：15〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：16〕

配列番号：2で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

10 配列番号：3で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

15 配列番号：5で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

配列番号：6で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：21〕

配列番号：7で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

25 配列番号：8で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

配列番号：9で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

配列番号：10で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

5 配列番号：11で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

配列番号：12で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

10 配列番号：13で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

配列番号：14で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：29〕

後述の実施例1および実施例4で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

後述の実施例1および実施例4で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

20 後述の実施例10および実施例27で用いられたプライマーRI-1の塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

後述の実施例10および実施例27で用いられたプライマーRI-3の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：33〕

後述の実施例10および実施例27で用いられたプライマーRI-1Claの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

後述の実施例10および実施例27で用いられたプライマーRI-3Xhoの

塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

ベータセルリンのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：36〕

- 5 ベータセルリンをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC2-76）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC24-76）のアミノ酸配列を示す。

- 10 〔配列番号：39〕

後述の実施例13で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

後述の実施例13および実施例16で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：41〕

後述の実施例16で用いられたプライマー5の塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

配列番号：37で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：43〕

配列番号：38で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

- 25 本発明のベータセルリン改変分子（BTC31-58, Asn, Pro, Ser, 59-80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：45〕

本発明のベータセルリン改変分子（Asn, Ser, Asp, Ser, Glu, BTC38-80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：46〕

のベータセルリン改変分子 (BTC 1-58, Asn, Pro, Ser, -80) のアミノ酸配列を示す。

配列番号: 47]

配列番号: 46 に示されるアミノ酸配列で表されるベータセルリン改変分子をコードする cDNA の塩基配列を示す。

[配列番号: 48]

配列番号: 44 に示されるアミノ酸配列で表されるベータセルリン改変分子をコードする cDNA の塩基配列を示す。

[配列番号: 49]

10 配列番号: 45 に示されるアミノ酸配列で表されるベータセルリン改変分子をコードする cDNA の塩基配列を示す。

[配列番号: 50]

後述の参考例 1 および実施例 22 で用いられたプライマー BT-95h の塩基配列を示す。

15 [配列番号: 51]

後述の参考例 1 および実施例 23 で用いられたプライマー BT-94h の塩基配列を示す。

[配列番号: 52]

後述の実施例 22 で用いられたプライマー PET-1 の塩基配列を示す。

20 [配列番号: 53]

後述の実施例 22 で用いられたプライマー BTC-1 の塩基配列を示す。

[配列番号: 54]

後述の実施例 22 で用いられたプライマー BTC-2 の塩基配列を示す。

[配列番号: 55]

25 後述の実施例 22 で用いられたプライマー BTC-3 の塩基配列を示す。

[配列番号: 56]

後述の実施例 23 で用いられたプライマー BTC-7 の塩基配列を示す。

後述の実施例 1 で得られた形質転換体大腸菌 [エシェリヒア コリ (Esch

erichia coli)] MM294 (DE3) / pTCIIBTC77は、
受託番号FERM BP-6584として1998年11月24日付で通産省工
業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH; 日本国茨城県つくば市東1-1-
3) に寄託されている。また1998年11月2日付で受託番号IFO 162
5 14として財団法人発酵研究所 (IFO; 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2
-17-85) に寄託されている。

後述の実施例4で得られた形質転換体大腸菌 [エシェリヒア コリ (Esch
erichia coli)] MM294 (DE3) / pTCIIBTC76は、
受託番号FERM BP-6583として1998年11月24日付で通産省工
10 業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。また1998年11月2日
付で受託番号IFO 16213として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託さ
れている。

後述の実施例13で得られた形質転換体大腸菌 [エシェリヒア コリ (Esch
erichia coli)] MM294 (DE3) / pTCIIBTC2-
15 76は、受託番号FERM BP-6948として1999年11月24日付で
通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。また1999年1
1月9日付で受託番号IFO 16334として財団法人発酵研究所 (IFO)
に寄託されている。

後述の実施例16で得られた形質転換体大腸菌 [エシェリヒア コリ (Esch
erichia coli)] MM294 (DE3) / pTCIIBTC24
20 -76は、受託番号FERM BP-6949として1999年11月24日付
で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。また1999年
11月9日付で受託番号IFO 16335として財団法人発酵研究所 (IFO)
に寄託されている。

25 後述の参考例1で用いられたプラスミドpTB1516を保持するEsche
richia coli MM294 (DE3) / pLysS, pTB1516は、
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に1992年 (平成
4年) 4月21日から受託番号FERM BP-3836として寄託され、また財
団法人発酵研究所に1992年 (平成4年) 4月16日から受託番号IFO 15
30 282として寄託されている。

以下に実施例および参考例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

5 実施例 1

77 残基型 (C 末端 3 残基欠失型) ベータセルリン発現株の構築

77 残基型 (C 末端 3 残基欠失型) ベータセルリン発現プラスミドを、以下の
ように構築した [図 1] 。

77 残基型 (C 末端 3 残基欠失型) ベータセルリンの構造遺伝子を、ベータセ
10 ルリン発現プラスミド pBO41 [Senoら; Growth Factors,
13:181 (1996)] より、構造遺伝子上流に隣接して Nde I 切断部
位及び開始コドンを持つプライマー 1 (5'-CATATGGATGGGAATT
CCACCAGAAGTCCTG)、及び 77 番目のアスパラギン酸の後に終止
15 コドン及び Bam HI 切断部位を持つプライマー 2 (5'-GGATCCCTA
GTCAACTCTCTCACACCTTGCTCC) を用いて、PCR で増幅
した。PCR により増幅した遺伝子を、TA original cloning
kit (インヴィトロジェン社製) を用いて pCR2.1 ベクターに連結し、p
CR2.1/BTC77 を作製した。これを大腸菌 JM109 に導入し、アンピ
シリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。p
20 CR2.1/BTC77 を有する形質転換体を培養し、QIAprep 8 Min
iprep kit (キアゲン社製) を用いて pCR2.1/BTC77 を調製し
た。

pBR322 を Nde I で切断、T4 DNA ポリメラーゼ (DNA Blun
t i n g k i t, 宝酒造株式会社製) で末端を平滑化し、再度連結する事によつ
て、Nde I 認識部位を欠損させた pBRdesNde を作製した。pET3c
25 を Bgl II-EcoRV で切断し、約 0.26 kbp の断片を回収した後、
T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、pBRdesNde の Sca I 断
片と連結して、pBR/T7desNde を作製した。また、部位特異的変異導
入 (Quick Change, STRATAGENE 社製) により、pBR32

2のBam HI 認識部位を欠損させたpBR322desBamを作製した。pBR322desBamのSph I-Eco RV断片をpBR/T7desNdeのSph I-Eco RV断片と連結して、テトラサイクリン耐性発現ベクターpTCIIを作製した。pCR2.1/BTC77をNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い、約240 bpの77残基型ベータセルリン構造遺伝子をQIAquick Spin Purification Kit (キアゲン社製)を用いて回収した。発現ベクターpTCIIをNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約4.6 kbpのバンドを回収した。77残基型ベータセルリン構造遺伝子を発現ベクターpTCIIのNde I-Bam HI断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してテトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミドpTCIIBTC77とした。

このpTCIIBTC77を大腸菌MM294 (DE3) に導入して、テトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、77残基型ベータセルリン発現株MM294 (DE3) /pTCIIBTC77を取得した。

実施例2

77残基型ベータセルリン発現株の培養

77残基型ベータセルリン発現株MM294 (DE3) /pTCIIBTC77を10mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) 1リットルで30℃16時間培養した。得られた培養液150mLを主発酵用培地(1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3% リン酸二水素ナトリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.024% 硫酸マグネシウム、0.02% ニューポールLB-625、0.0005% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.0% カザミノ酸、1.0% イーストエキス) 1.5リットルを仕込んだ2L容ジャーファーマンターに移植して、37℃、通気量 2L/min、攪拌回転数 500rpmで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1200クレット単位になった時点で、5.95mg/L分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド

(IPTG)を添加した。IPTG添加時、添加後1, 2, 5時間に0.75%のグルコースを添加し培養開始9時間後まで培養を行った。培養液を10000rpmで30分間遠心分離を行い、菌体を集めた。

5 実施例3

Met-77残基型ベータセルリンの精製

実施例2で得られた菌体5gに1mM EDTA、1mM APMSF及び7M グアニジン塩酸塩を含む0.1M Tris-HCl (pH8.0) 10mLを加え、4℃で一晩攪拌し抽出を行った後、遠心分離(10000rpm、20分間)を行った。得られた上清液10mLに0.5mM 酸化型グルタチオン、1mM 還元型グルタチオン、1mM EDTA、0.1M アルギニン塩酸塩及び2M 尿素を含む50mM Tris-HCl (pH8.0) 250mLを加え、4℃で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離(10000rpm、20分間)を行い、遠心上清液260mLを得た。この遠心上清液をYM3膜(分画分子量: 3000、ミリポア社)を用いて濃縮を行った。濃縮脱塩液80mLに2M尿素有120mL加えた後、塩酸でpH5.0に調整した。遠心分離(10000rpm、20分間)を行い、得られた遠心上清液を50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)で平衡化したSP-トヨパール650Mカラム(2.2cm×12cm、東ソー社)に毎分10mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0Mから1.0Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。Met-77残基型ベータセルリンを含む画分を集め、その1/3量を0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50カラム(1.0cm×25cm、昭和電工社)に吸着させ、13.5%から21.2%のアセトニトリル直線濃度勾配によりMet-77残基型ベータセルリンを溶出した。同じ操作をさらに2回行い得られた溶出液を0.02%トリフルオロ酢酸で透析し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥粉末を蒸留水10mLで溶解し、酢酸型にしたAG1-X8カラム(1.0cm×10cm、日本バイオラッド社)を通過させた後、再度凍結乾燥を行いMet-77残基型ベータセルリン8mgを得た。

実施例 4

76 残基型 (C 末端 4 残基欠失型) ベータセルリン発現プラスミドの構築

76 残基型 (C 末端 4 残基欠失型) ベータセルリンの発現プラスミドは以下の
ように構築した [図 2] 。

- 5 76 残基型 (C 末端 4 残基欠失型) ベータセルリンの構造遺伝子を、実施例 1
で構築した pTCII/BTC77 より、構造遺伝子上流に隣接して Nde
I 切断部位及び開始コドンを持つプライマー 1 (5'-CATATGGATGGG
AATTCCACCAGAAGTCCTG) 及び 76 番目のバリンの後に終止コ
ドン及び BamHI 切断部位を持つプライマー 2 (5'-GGATCCCTAA
10 ACTCTCTCACACCTTGCTCCAATG) を用いて、PCR で増幅
した。PCR により増幅した遺伝子を、TA original cloning
kit (インヴィトロジェン社製) を用いて pCR2.1 ベクターに連結し、p
CR2.1/BTC76 を作製した。これを大腸菌 JM109 に導入し、アンピ
シリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。
15 pCR2.1/BTC76 を有する形質転換体を培養し、QIAprep 8 Mi
niprep kit (キアゲン社製) を用いて pCR2.1/BTC76 を調製
した。

- pCR2.1/BTC76 を Nde I 及び BamHI で切断してアガロース
電気泳動を行い、約 240 bp の 76 残基型ベータセルリン構造遺伝子を QIA
20 quick Spin Purification Kit (キアゲン社製) を用い
てを回収した。実施例 1 で調製した発現ベクター pTCII を Nde I 及び Ba
mHI で切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約 4.6 kbp のバンドを
回収した。76 残基型ベータセルリン構造遺伝子を発現ベクター pTCII の N
de I - BamHI 断片と連結した後、大腸菌 JM109 に導入してテトラサ
25 イクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発
現プラスミド pTCIIBTC76 とした。

 この pTCIIBTC76 を大腸菌 MM294 (DE3) に導入して、テトラ
サイクリン耐性で形質転換株を選択し、76 残基型ベータセルリン発現株 MM2
94 (DE3) / pTCIIBTC76 を取得した。

実施例 5

76残基型ベータセルリン発現株の培養

76残基型ベータセルリン発現株MM294 (DE3) / pTCIIIBC7
5 6を10mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1% ペプトン、0.5%
酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) 1リットルで30℃16時間培養した。
得られた培養液を主発酵用培地(1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3%
リン酸二水素ナトリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリ
10 ウム、0.024% 硫酸マグネシウム、0.02% ニューポールLB-625、
0.0005% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.0% カザミノ酸、1.
0% イーストエキス) 20リットルを仕込んだ50L容発酵槽に移植して、3
7℃、通気量20L/min、攪拌回転数210rpmで通気攪拌培養を開始し
た。培養液の濁度が約1200クレット単位になった時点で、5.95mg/L
15 のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加した。I
PTG添加時、添加後2及び3.5時間にそれぞれ0.75%のグルコースを添
加し培養開始11時間後まで培養を行った。培養液を10000rpmで30分
間遠心分離を行い、菌体540gを集めた。

実施例 6

Met-76残基型ベータセルリンの精製

20 実施例5で得られた菌体375gに1mM EDTA、1mM APMSF及び
7M グアニジン塩酸塩を含む0.1M Tris-HCl (pH8.0) 1.0
Lを加え、4℃で一晩攪拌し抽出を行った後、遠心分離(10000rpm、2
0分間)を行った。得られた上清液1.0Lに0.5mM 酸化型グルタチオン、
25 1mM 還元型グルタチオン、1mM EDTA、0.1M アルギニン塩酸塩及び
2M 尿素を含む50mM Tris-HCl (pH8.0) 19Lを加え、4℃
で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離(10000rpm、20分間)
を行い、遠心上清液20Lを得た。この遠心上清液をペリコンカセットシステム
(分画分子量: 5000、ミリポア社)を用いて濃縮を行った。濃縮脱塩液3.

3 Lに2 M 尿素を13.2 L加えた後、塩酸でpH 5.0に調整した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で平衡化したPOROS 50 HSカラム(2.2 cm×12 cm、日本パーセプティブ社)に毎分30 mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0.3 Mから1.3 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、蒸留水で3倍に希釈した後、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)で平衡化したTSK gel CM-5 PWカラム(2.15 cm×15 cm、東ソー社)に添加した。Met-76残基型ベータセルリンが吸着したTSK gel CM-5 PWカラムを、0.24 Mから0.44 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。Met-76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、0.1 %トリフルオロ酢酸で平衡化したTSK gel ODS-120 Tカラム(2.15 cm×30 cm、東ソー社)に吸着させ、17%から24%のアセトニトリル直線濃度勾配によりMet-76残基型ベータセルリンを溶出した。溶出液を0.02 % トリフルオロ酢酸で透析し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥粉末を蒸留水10 mLで溶解し、酢酸型にしたAG1-X8カラム(1.0 cm×10 cm、日本バイオラッド社)を通過させた後、再度凍結乾燥を行いMet-76残基型ベータセルリン93 mgを得た。

実施例 7

20 ベータセルリン改変体の特徴の決定

実施例 3 で得られたMet-77残基型ベータセルリン及び実施例 6 で得られたMet-76残基型ベータセルリンの特徴を以下のように決定した。

a) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を用いた分析

25 ベータセルリン改変体及び特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリンをサンプルバッファー(125 mM Tris-HCl、1 % ドデシル硫酸ナトリウム、15 % グリセロール、5 % 2-メルカプトエタノール、0.005 % ブロムフェノールブルー)で懸濁し、マルチゲル15/25(第一化学薬品)で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラピッド CBB KANTO(関東化学社)で染色を行ったところ、いずれもほ

ば単一バンドであった〔図3〕。

b) アミノ酸組成分析

ベータセルリン改変体を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計（日立L-8500AAmino Acid Analyzer）を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、いずれの改変体も開始コドンATGに由来するメチオニンを含み、cDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した〔表1、表2〕。

〔表1〕 77残基型ベータセルリンのアミノ酸組成分析

	1モル当たりの残基数	理論値
Asx	7.2	7
Thr	6.0	6
Ser	4.6	5
Glx	9.1	9
Pro	3.9	4
Gly	7.1	7
Ala	4.0	4
Val	3.7	4
Met	0.9	1
Ile	2.0	2
Leu	2.1	2
Tyr	3.0	3
Phe	2.1	2
Lys	5.0	5
His	3.0	2
Arg	6.8	7
Cys	ND	8

〔表2〕 76残基型ベータセルリンのアミノ酸組成分析

	1モル当たりの残基数	理論値
Asx	6. 2	6
Thr	6. 1	6
Ser	5. 1	5
Glx	9. 4	9
Pro	4. 1	4
Gly	7. 4	7
Ala	4. 1	4
Val	3. 8	4
Met	1. 0	1
Ile	2. 0	2
Leu	2. 0	2
Tyr	3. 1	3
Phe	2. 1	2
Lys	5. 0	5
His	2. 3	2
Arg	7. 1	7
Cys	ND	8

5 c) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列分析を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、いずれの改変体もcDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。いずれの改変体も80残基型と同様に開始コドンATGに由来するメチオニンをN末端に有していた

10 〔表3, 表4〕。

〔表3〕 77残基型ベータセルリンのN末端アミノ酸配列分析

	検出されたPTH-アミノ酸(pmole)	塩基配列から予想されるアミノ酸
1	Met(809)	(Met)
2	Asp(492)	Asp
3	Gly(615)	Gly
4	Asn(425)	Asn
5	Ser(161)	Ser
6	Thr(276)	Thr
7	Arg(253)	Arg
8	Ser(66)	Ser
9	Pro(168)	Pro
10	Glu(127)	Glu

5 〔表4〕 76残基型ベータセルリンのN末端アミノ酸配列分析

	検出されたPTH-アミノ酸(pmole)	塩基配列から予想されるアミノ酸
1	Met(195)	(Met)
2	Asp(213)	Asp
3	Gly(413)	Gly
4	Asn(292)	Asn
5	Ser(99)	Ser
6	Thr(151)	Thr
7	Arg(198)	Arg
8	Ser(54)	Ser
9	Pro(149)	Pro
10	Glu(79)	Glu

d) C末端アミノ酸分析

10 気相ヒドラジン分解法(100℃、6時間)により、C末端アミノ酸をアミノ酸分析計(日立L-8500AAmino Acid Analyzer)を用いて決定した。Met-77残基型ベータセルリンではアスパラギン酸が、Met-76残基型ベータセルリンではバリンが検出された〔表5、表6〕。

〔表5〕

77残基型ベータセルリンのC末端アミノ酸分析
Asp (収率:32.5%)

〔表6〕

76残基型ベータセルリンのC末端アミノ酸分析
Val (収率:77.8%)

5 実施例 8

3 T 3 細胞を用いた増殖促進活性の測定

モレキュラー・セル・バイオロジー、8巻、588(1988)に記載のごとく、静止状態の3 T 3 A 3 1-7 1 4クローン4(インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、12巻、463(1973))中への³H-チミジンの取り込みによって増殖促進活性を測定した。

すなわち、5%ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて、1000細胞/mLになるように懸濁した3 T 3 A 3 1-7 1 4クローン4を96ウェルプレートに100μLずつ播き、炭酸ガスインキュベーター内(5%炭酸ガス、95%空気)において37℃で1日培養した。上清75μLを抜き取り、血清を含まないダルベッコ改変イーグルMEM培地を100μL加える事により血清濃度を1%にした。さらに2日間培養した後、種々の濃度の実施例3で調製したMet-77残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリン及び特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリンを添加した。添加16時間後に³H-チミジン[アマーシャム・ファルマシア・バイオテク]を0.25μCi/well加え、その4時間後に細胞をPBSで3回洗浄した後、5%SDSを100μL加え細胞を溶解した。細胞溶解液をシンチレーションバイアルに移し、シンチレーターA(和光純薬社)を1mL加え、シンチレーションカウンターで³H-チミジンの細胞への取り込みを測定した〔図4〕。

25

実施例 9

AR 4 2 J細胞を用いた β 細胞分化促進活性の測定

化学発癌剤で誘発された膵臓癌由来細胞株AR 4 2 J [Chiristophe ; アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギー (Am. J. Physiol.), 266:G963 (1994)] を、実施例3で調製したMet-77
5 残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリン
または特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残
基型ベータセルリン及び10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM
培地を用いて 10^5 細胞/mLになるように懸濁し、500 μ Lをチャンバース
ライドに播き、炭酸ガスインキュベーター内(5% 炭酸ガス、95%空気)に
10 おいて37℃で5日間培養した。5日後に細胞をPBSで1回洗浄した後に、1
0%ホルムアルデヒドで固定し、0.1% トライトンX-100で5分間処理し
た後に、ブロックエース(雪印、日本)を添加し室温で40分間ブロッキングを
行った。10% ブロックエースで希釈した抗インスリン抗体(アドバンスド・イ
ムノ・ケミカル社)を添加し室温、40分間反応した。0.1% トライトンX-
15 100を添加し室温5分間放置した後、PBSで3回洗浄した。10% ブロック
エースで希釈したFITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗マウスIgG抗体(カッペル社)を添加し、室温で40分間反応
した。0.1% トライトンX-100を添加し室温5分間放置した後、PBSで
3回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。いずれのベータセルリンを添加した場合に
20 おいても、蛍光染色された細胞、すなわちインスリンを産生する β 細胞に分化し
た細胞が観察された〔図5〕。

実施例10

ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ遺伝子発現ベクターの構築

25 β 細胞への分化促進活性はインスリンプロモーターの下流にレポーターとして
アルカリフォスファターゼを連結したものにより形質転換されたAR 4 2 J細胞
を用いても実施した。すなわちベータセルリンにより β 細胞へと分化した細胞
はアルカリフォスファターゼを産生し、このアルカリフォスファターゼの活性を
測定することにより β 細胞への分化促進活性を定量的に測定することが可能であ

る。

ラット尾から常法に従ってゲノムDNAを調製した。このDNAをテンプレートとして、既報のラットインスリンII遺伝子プロモーターの塩基配列 (Gen Bank: Accession No. J00748) をもとに合成したプライマーRI-1 [5'-AGAGTCAAGGATCCCCCAACCACT-3'] およびRI-3 [5'-AGCTGGTCACTTAGGGCTGGGG-3'] を用いてPCR法によりインスリンプロモーター領域0.75Kbを増幅した。さらに、このPCR産物をテンプレートとしてプライマーRI-1C1a [5'-GAATCGATAGAGTCAAGGATCCCCCA-3'] およびRI-3Xho [5'-GACTCGAGCTGGTCACTTAGGG-3'] を用いてPCRを行った。増幅された0.75Kb DNA断片を単離し、pTB7 Blueベクター (Novagen 69820-1) に組み込んで得られたプラスミドpTB1881を用いてクローニングされた断片の塩基配列を決定し、ラットインスリンプロモーターであることを確認した。プラスミドpTB1881をXho I-C1a Iで切断してラットインスリンプロモーターである0.73kb DNA断片を得た。次にヒト胎盤アルカリフォスファターゼ (PLAP) をコードする2.0 kb cDNA (J. Bergerら、Gene 66, 1 (1988)) の発現プラスミドpTB1330をXho I-Hind IIIで切断して得られた2.7kb DNA断片 (PLAP cDNA、SV40由来スプライシング部位およびポリA付加部位、pBR322由来oriおよびアンピシリン耐性遺伝子を含む) を単離し、前述のラットインシュリンプロモーター領域0.73kb Xho I-C1a I断片をT4 DNAリガーゼ反応によって連結してプラスミドpTB1898を得た。

実施例11

PLAP発現AR42J細胞の構築

AR42J細胞にPLAP発現プラスミドpTB1898とTn5のneo^r遺伝子を含むプラスミドpMCneopoly A (STRATAGENE) をトランスフェクション試薬TransITTM-LT1 (Mirus、PenVe

ra Corporation)を用いて同時に導入した。導入後の細胞は10%牛胎児血清を加えたDMEMで2日間培養した後、G418 (ゲネテシン、GIBCO BRL) 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した選択培地に加えて培養を続けた。G418耐性となって生育した細胞を限界希釈法によりクローンを単離した。

- 5 各クローンの細胞を24穴プレートに播き、Met-80残基型ベータセルリンを20 ng/mL 添加および無添加で4日間培養し、培養上清を集めて65℃30分間熱処理を行った後、培地中のアルカリフォスファターゼ活性を測定した。80残基型ベータセルリン添加時にアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められるクローンを選択した。いくつかのクローンの結果を以下の〔表7〕
- 10 に示す。

〔表7〕

クローン	PLAP活性(A 405)	
	BTC無添加	BTC添加
AR1898-033	0.034	0.366
AR1898-053	0.008	0.089
AR1898-0192	0.077	0.752

実施例12

- 15 PLAP発現AR42J細胞を用いた β 細胞分化促進活性の測定

実施例11で構築したPLAP発現AR42J細胞を、各種濃度の実施例3で調製したMet-77残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリンまたは特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリン及び10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて 10^5 細胞/ mL になるように懸濁し、100 μL を96ウェルプレートに播き、炭酸ガスインキュベーター内(5%炭酸ガス、95%空気)において37℃で5日間培養した。5日後に培養上清をサンプリングし、65℃で30分間処理した後、50 μL をあらかじめ50 μL の2X SEAP (2M ジエタノールアミン、1mM MgCl_2 、20mM ホモアルギニン)を添加した96ウェルマイクロプレートに加えた。37℃で10分間保つ

20

25

た後、20mg/mLのp-ニトロフェニルリン酸（シグマ社）を10 μ L添加し37℃で16時間反応を行った〔図6〕。Met-77残基型ベータセルリンおよびMet-76残基型ベータセルリンはMet-80残基型ベータセルリンとほぼ同じ分化誘導促進活性を示した。

5

実施例13

2-76残基型（N末端1残基、C末端3残基欠失型）ベータセルリン発現株の構築

2-76残基型（N末端1残基、C末端3残基欠失型）ベータセルリンの発現プラスミドは以下のように構築した〔図7〕。

2-76残基型（N末端1残基、C末端3残基欠失型）ベータセルリンの構造遺伝子を、76残基型（C末端3残基欠失型）ベータセルリン発現プラスミドpTCIIBTC76〔実施例4〕より、2番目のグリシンの上流に隣接してNde I切断部位及び開始コドンを持つプライマー3（5'-CAGCATATGGGGAATTCCACCAGAAGTCCT）、およびC末端のバリンの後に終止コドン及びBam HI切断部位を持つプライマー4（5'-GGATCCCTAAACTCTCTCACACCTTGCTCCAATG）を用いて、PCRで増幅した。PCRにより増幅した遺伝子を、TA original cloning kit（インヴィトロジェン社製）を用いてpCR2.1ベクターに連結し、pCR2.1BTC2-76を作製した。これを大腸菌JM109に導入し、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1BTC2-76を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit（キアゲン社製）を用いてpCR2.1BTC2-76を調製した。

pCR2.1BTC2-76をNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い、約230 bpの2-76残基型ベータセルリン構造遺伝子をQIAGEN gel extraction kit（キアゲン社製）を用いて回収した。発現ベクターpTCII〔実施例1〕をNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約4.6 kbpのバンドを回収した。2-76残基型ベータセルリン構造遺伝子を発現ベクターpTCIIのNde

25

I-Bam HI断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してテトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミドpTCIIBTC2-76とした。

このpTCIIBTC2-76を大腸菌MM294 (DE3)に導入して、テトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、2-76残基型ベータセルリン発現株MM294 (DE3) / pTCIIBTC2-76を取得した。

実施例14

2-76残基型ベータセルリン発現株の培養

2-76残基型ベータセルリン発現株MM294 (DE3) / pTCIIBTC2-76を10mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) 30mLで30℃、16時間培養した。得られた培養液を主発酵用培地(1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3% リン酸二水素ナトリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.012% 硫酸マグネシウム、0.0007% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.5% ハイケース) 200mLを入れた1L容マイヤー6本に10mlずつ移植して、37℃、攪拌回転数200rpmで攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約160クレット単位になった時点で、5.95mg/L分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加した。IPTG添加後4時間後まで培養を行った。培養液を9000rpmで30分間遠心分離を行い、菌体5.1gを集めた。

実施例15

2-76残基型ベータセルリンの精製

実施例14で得られた菌体5gに1mM EDTA、1mM APMSF及び7M グアニジン塩酸塩を含む0.1M Tris-HCl (pH8.0) 15mLを加え、4℃で一晩攪拌し抽出を行った後、遠心分離(9000rpm、10分間)を行った。得られた上清液15mLに0.5mM 酸化型グルタチオン、1mM 還元型グルタチオン、1mM EDTA、0.1M アルギニン塩酸塩及び2M

尿素を含む50mM Tris-HCl (pH8.0) 250mLを加え、4℃で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離(10000rpm、10分間)を行い、遠心上清液265mLを得た。この遠心上清液に2M 尿素を1L加えた後、酢酸でpH5.0に調整し、4℃で一晩静置した。遠心分離(10000rpm、10分間)を行い、得られた遠心上清液を50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)で平衡化したPOROS 50HSカラム(2.2cm×12cm、日本パーセプティブ社)に毎分30mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0.3Mから1.3Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。2-76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で3倍に希釈した後、この緩衝液で平衡化したTSKgel CM-5PWカラム(0.75cm×7.5cm、東ソー社)に添加した。2-76残基型ベータセルリンが吸着したTSKgel CM-5PWカラムを、0.3Mから0.5Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。2-76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したTSKgel ODS-120Tカラム(2.15cm×30cm、東ソー社)に吸着させ、20%から44%のアセトニトリル直線濃度勾配により2-76残基型ベータセルリンを溶出した。溶出液を凍結乾燥した後、蒸留水5mLで溶解し、酢酸型にしたAG1-X8カラム(1.0cm×10cm、日本バイオラッド社)を通過させた後、再度凍結乾燥を行い2-76残基型ベータセルリン0.7mgを得た。

実施例16

24-76残基型(N末端23残基、C末端3残基欠失型)ベータセルリン発現株の構築

24-76残基型(N末端23残基、C末端3残基欠失型)ベータセルリンの発現プラスミドは以下のように構築した〔図8〕。

24-76残基型(N末端23残基、C末端3残基欠失型)ベータセルリンの構造遺伝子を、実施例4で調製した76残基型(C末端3残基欠失型)ベータセルリン発現プラスミドpTCIIBTC76より、24番目のアラニンの上流に

隣接してNde I 切断部位及び開始コドンを持つプライマー5 (5' - CAGC
ATATGGCTACCAACCACACAATCAAAG)、およびC末端のバ
リンの後に終止コドン及びBam HI 切断部位を持つプライマー4 (5' - GG
ATCCCTAAACTCTCTCACACCTTGCTCCAATG) を用い
て、PCRで増幅した。PCRにより増幅した遺伝子を、TA original
cloning kit (インヴィトロジェン社製) を用いてpCR2. 1ベク
ターに連結し、pCR2. 1BTC24-76を作製した。これを大腸菌JM1
09に導入し、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.
1BTC24-76を有する形質転換体を培養し、QIAprep 8 Minip
rep kit (キアゲン社製) を用いてpCR2. 1BTC24-76を調製し
た。

pCR2. 1BTC24-76をNde I 及びBam HI で切断してアガロ
ース電気泳動を行い、約160bpの24-76残基型ベータセルリン構造遺伝
子をQIAGEN gel extraction kit (キアゲン社製) を用い
て回収した。実施例1で調製した発現ベクターpTCIIをNde I 及びBam
HI で切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約4.6kbpのバンドを回
収した。24-76残基型ベータセルリン構造遺伝子を発現ベクターpTCII
のNde I - Bam HI 断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してテト
ラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、
発現プラスミドpTCIIBTC24-76とした。

このpTCIIBTC24-76を大腸菌MM294 (DE3) に導入して、
テトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、24-76残基型ベータセルリン
発現株MM294 (DE3) pTCIIBTC24-76を取得した。

実施例17

24-76残基型ベータセルリン発現株の培養

24-76残基型ベータセルリン発現株MM294 (DE3) / pTCIIB
TC24-76を10mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1% ペプト
ン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) 30mLで30℃、16

時間培養した。得られた培養液を主発酵用培地（1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3% リン酸二水素ナトリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.012% 硫酸マグネシウム、0.0007% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.5% ハイケース）150mLを入れた1L容量マイヤー5本に移植して、37℃、攪拌回転数200rpmで攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約160クレット単位になった時点で、5.95mg/L分のイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加した。IPTG添加後4時間後まで培養を行った。培養液を10000rpmで30分間遠心分離を行い、菌体3.9gを集めた。

実施例18

24-76残基型ベータセルリンの精製

実施例5で得られた菌体3.9gに1mM EDTA、1mM APMSF及び7M グアニジン塩酸塩を含む0.1M Tris-HCl（pH8.0）12mLを加え、4℃で一晩攪拌し抽出を行った後、遠心分離（9000rpm、10分間）を行った。得られた上清液12mLに0.5mM 酸化型グルタチオン、1mM 還元型グルタチオン、1mM EDTA、0.1M アルギニン塩酸塩及び2M 尿素を含む50mM Tris-HCl（pH8.0）200mLを加え、4℃で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離（10000rpm、10分間）を行い、遠心上清液212mLを得た。この遠心上清液に2M尿素を0.8L加えた後、酢酸でpH5.0に調整し、4℃で一晩静置した。遠心分離（10000rpm、10分間）を行い、得られた遠心上清液を50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）で平衡化したPOROS 50HSカラム（2.2cm×12cm、日本パーセプティブ社）に毎分30mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0.3Mから1.3Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。24-76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）で3倍に希釈した後、この緩衝液で平衡化したTSK gel CM-5PWカラム（0.75cm×7.5cm、東ソー社）に添加した。24-76残基型ベータセルリンが吸着したTSK gel

CM-5PWカラムを、0.3Mから0.5Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。24-76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したTSKgel ODS-120Tカラム(2.15cm×30cm、東ソー社)に吸着させ、20%から44%のアセトニトリル直線濃度勾配により24-76残基型ベータセルリンを溶出した。溶出液を凍結乾燥した後、蒸留水5mLで溶解し、酢酸型にしたAG1-X8カラム(1.0cm×10cm、日本バイオラッド社)を通過させた後、再度凍結乾燥を行い24-76残基型ベータセルリン0.4mgを得た。

実施例19

ベータセルリン改変体の特徴の決定

実施例3で得られた2-76残基型ベータセルリン及び実施例6で得られた24-76残基型ベータセルリンの特徴を以下のように決定した。

a) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を用いた分析

ベータセルリン改変体及び実施例6で調製した76残基型ベータセルリンをサンプルバッファー(125mM Tris-HCl、1%ドデシル硫酸ナトリウム、15%グリセロール、5%2-メルカプトエタノール、0.005%ブロムフェノールブルー)で懸濁し、マルチゲル15/25(第一化学薬品)で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラピッドCBB KANTO(関東化学社)で染色を行ったところ、いずれもほぼ単一バンドであった〔図9〕。

b) アミノ酸組成分析

ベータセルリン改変体を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計(日立L-8500AAmino Acid Analyzer)を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、いずれの改変体もcDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した〔表8、表9〕。

〔表8〕 2-76残基型ベータセルリンのアミノ酸組成分析

アミノ酸	1モル当たりの残基数	理論値
Asx	5. 2	5
Thr	6. 0	6
Ser	4. 6	5
Glx	9. 4	9
Pro	4. 3	4
Gly	7. 3	7
Ala	4. 2	4
Val	4. 1	4
Met	0. 0	0
Ile	2. 0	2
Leu	2. 0	2
Tyr	2. 9	3
Phe	2. 1	2
Lys	5. 1	5
His	2. 3	2
Arg	7. 2	7
Cys	ND	8

〔表9〕 24-76残基型ベータセルリンのアミノ酸組成分析

アミノ酸	1モル当たりの残基数	理論値
Asx	1. 0	1
Thr	3. 8	4
Ser	2. 9	3
Glx	6. 0	6
Pro	2. 1	2
Gly	4. 0	4
Ala	3. 0	3
Val	3. 9	4
Met	0. 0	0
Ile	2. 0	2
Leu	0. 0	0
Tyr	2. 9	3
Phe	2. 1	2
Lys	4. 9	5
His	2. 2	2
Arg	6. 0	6
Cys	ND	6

c) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列分析を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、いずれの改変体も c
DNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致した〔表10, 表11〕。

〔表10〕 2-76残基型ベータセルリンのN末端アミノ酸配列分析

	検出されたPTH-アミノ酸(pmole)	塩基配列から予想されるアミノ酸
1	Gly (388)	Gly
2	Asn (319)	Asn
3	Ser (245)	Ser
4	Thr (261)	Thr
5	Arg (225)	Arg
6	Ser (144)	Ser
7	Pro (246)	Pro
8	Glu (105)	Glu
9	Thr (120)	Thr
10	Asn (162)	Asn

10

〔表11〕 24-76残基型ベータセルリンのN末端アミノ酸配列分析

	検出されたPTH-アミノ酸(pmole)	塩基配列から予想されるアミノ酸
1	Ala (463)	Ala
2	Thr (251)	Thr
3	Thr (245)	Thr
4	Thr (483)	Thr
5	Gln (302)	Gln
6	Ser (109)	Ser
7	Lys (64)	Lys
8	Arg (145)	Arg
9	Lys (209)	Lys
10	Gly (170)	Gly

d) C末端アミノ酸分析

気相ヒドラジン分解法（100℃、6時間）により、C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。いずれの改変体もバリンが検出された〔表12、表13〕。

〔表12〕

2-76残基型ベータセルリンのC末端アミノ酸分析	
Val	（収率：95.4 %）

〔表13〕

24-76残基型ベータセルリンのC末端アミノ酸分析	
Val	（収率：83.3 %）

10 実施例20

1) A431細胞を用いたEGFバインディングアッセイ

EGFレセプター高発現株であるヒト扁平上皮癌細胞A431細胞を用いた¹²⁵I-EGFに対する結合阻害活性によって細胞増殖促進活性を測定した。

すなわち、10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM（DMEM）培地を用いて、10⁵細胞/mLになるように懸濁したA431細胞を96ウェルプレートに100μLずつ播き、炭酸ガスインキュベーター内（5%炭酸ガス、95%空気）において37℃で2日間培養した。2日後に20mM HEPESおよび0.1% ウシ血清アルブミンを含む、DMEMとF-12を等量混合した結合培地200μL/ウェルで3回洗浄した後、各種濃度の標識されていないEGF、実施例15で調製した2-76残基型ベータセルリン、実施例18で調製した24-76残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリン、または特開平10-191989号に記載の用法により調製したMet-80残基型ベータセルリン及び0.25nM ¹²⁵I-EGF（アマシャム・ファルマシア・バイオテク）を含む結合培地100μLを添加した。

4℃、90分静置した後に結合培地200μLで3回洗浄し、1% SDSを含む0.1N 水酸化ナトリウム水溶液200μLで細胞を溶解した。細胞溶解液をシ

ンチレーションバイアルに移し、シンチレーターA（和光純薬社）を1 mL 加え、シンチレーションカウンターで ^{125}I -EGFに対する結合阻害活性を測定した。

2) ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ発現AR 4 2 J細胞を用いた β 細胞分化促進活性の測定

- 5 PLAP発現AR 4 2 J細胞を、各種濃度の実施例15で調製した2-76残基型ベータセルリン、実施例18で調製した24-76残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリン、または特開平10-191989号に記載の用法により調製したMet-80残基型ベータセルリン及び10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて 10^5
- 10 細胞/mLになるように懸濁し、100 μL を96ウェルプレートに播き、炭酸ガスインキュベーター内（5%炭酸ガス、95% 空気）において37℃で5日間培養した。5日後に培養上清をサンプリングし、65℃で30分間処理した後、50 μL をあらかじめ50 μL の2xSEAP（2M ジエタノールアミン、1mM MgCl_2 、20mM ホモアルギニン）を添加した96ウェルマイクロプレートに加えた。20mg/mLのp-ニトロフェニルリン酸（シグマ社）を10 μL
- 15 L添加し37℃で16時間反応を行った。いずれの改変体もEGF活性対BTC活性の比がMet-80残基型ベータセルリンの5%ほどに低下し、Met-76残基型ベータセルリンと同程度でありN末欠失による影響は認められなかった。
- 3)上記1) および2) の結果を〔表14〕にまとめ示す。

20

〔表14〕

	BTC活性 $\text{EC}_{50}(\text{nM})$	EGF活性 $\text{IC}_{50}(\text{nM})$	EGF/BTC 対 Met-BTC80
Met-BTC80	0.07	1.2	100.0%
Met-BTC76	0.30	95.1	5.4%
BTC2-76	0.12	38.6	5.3%
BTC24-76	0.03	11.0	4.7%

実施例21

Cys 3-Cys 4間にヘレギュリン（Her）に由来する3残基が挿入され

たhBTC50改変分子A発現プラスミドpTB1985の構築

pTB1976をテンプレートとして、(1) 5'側プライマーPET-1: 5'-GAAATAATTTTGTCTTAACCTTTAAGAAGGAG-3'および3'側プライマーBTC-1: 5'-AGGAGGGCGTCGAGGGGGTTCTGCTCGGCCA-3'、(2) 5'側プライマーBTC-2: 5'-TGGCCGAGCAGAACCCCTCGACGCCCTCCT-3'および3'側プライマーBTC-3: 5'-TCTATGCGCACCCGTTCTCTCGGAGCACTGTC-3'を用いて、それぞれPCRを行った。

次に(1)と(2)のPCR産物の混合物をテンプレートとして、5'側プライマーBT-95h、3'側プライマーBT-94hを用いてPCRを行い、hBTC50のCys3-Cys4間にHerの配列中の3アミノ酸(Asn, Pro, Ser)を挿入した改変分子AをコードするDNA断片を得た。このDNA断片をNdeIおよびBamHIで消化後、pET-3cのNdeI-BamHI部位に組み込み、pTB1985を作製した。

実施例22

N末7残基をその部位に相当する上皮成長因子(EGF)の5残基で置換されたhBTC50改変分子B発現プラスミドpTB1987の構築

pTB1976をテンプレートとして、5'側プライマーBTC-7: 5'-TATACATATGAACAGCGACTCTGAGTGCCCCAAGC-3'および3'側プライマーBT-94hを用いてPCRを行い、hBTC50のN末7残基を相当するEGFの5残基に置換した改変分子BをコードするDNA断片を得た。このDNA断片をNdeIおよびBamHIで消化後、pET3cのNdeI-BamHI部位に組み込み、pTB1987を作製した。

実施例23

大腸菌での発現

T7ファージのΦ10プロモーターの支配下に、後述の参考例および上記の実施例で得られたプラスミドpTB1976、プラスミドpTB1985およびプ

ラスミド pTB1987 を、発現用大腸菌 BL21 (DE3) / pLysS (Novagen) に導入した。それぞれの大腸菌組換え体を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンおよび $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコールを含む LB 培地を用いて 37°C で培養した。クレットユニット 160 の時点でイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシドを最終濃度 0.4 mM になるように添加し、さらに 37°C で 4 時間培養を継続した。培養後遠心により集菌し、抽出操作まで -80°C で保存した。

実施例 24

hBTC50、改変分子 A および改変分子 B の精製

4-1) 大腸菌封入体の調製

400 ml の培養液から集めた菌体を 20 ml の 10 mM Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$)、 10% sucrose、 10 mM EDTA に懸濁して、凍結・融解した後、氷中に 30 分間静置して完全に細胞を溶かした。氷冷下で超音波破碎 (10 sec , 3 回) 後、遠心 (9000 rpm , 15 min , 4°C : Beckman) して再度沈殿を集めた。この洗浄操作を 3 回繰り返して封入体を調製した。

4-2) タンパクの抽出およびリフォールディング

4-1) で得られた封入体を 8 ml の $7 \text{ M guanidine-HCl}$ 、 $0.1 \text{ M Tris-CH}_3\text{COOH}$ ($\text{pH} 8.0$)、 1 mM EDTA に懸濁して 4°C 、1 時間スターラーで穏やかに攪拌し、組換えタンパクを抽出した。次に還元型グルタチオンを 0.1 M になるように添加して、 NaOH 溶液で pH を 8.4 に合わせた後、抽出液中に窒素ガスを吹き込み空気と置換した。室温で 2 時間静置した後、20 倍容量の $10 \text{ mM Tris-CH}_3\text{COOH}$ ($\text{pH} 8.0$)、 0.5 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、 1 mM ベンズアミジンで希釈した。遠心 (9000 rpm , 15 min , 25°C) して不溶物を除いた上清に、酸化型グルタチオンを 0.5 mM になるように添加し、室温で 16 時間静置した。次いで、遠心 (9000 rpm , 15 min , 25°C) 上清を凍結乾燥して濃縮後、 4°C で $50 \text{ mM Tris-CH}_3\text{COOH}$ ($\text{pH} 5.5$)、 1 mM EDTA に透

析 (Spectra por: MWCO 1,000) した。透析後、遠心 (9000 rpm, 15 min, 4℃) 上清を酢酸セルロース膜 (Millex GV, 0.22 μ m: Millipore) で濾過して、不溶物を除いた。

4-3) タンパクの精製

- 5 リフォールディングしたタンパクを含む溶液を 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.5) で平衡化した陽イオン交換 HPLC カラム (250 \times 4.1 mm I. d., Synchron CM300, Synchronopak) にかけて、0-1 M の NaCl 濃度勾配でタンパクを溶出、分画した。OD₂₈₀ でモニターした溶出画分を、0.1% HCl、1% CH₃CN で平衡化した C₄ 逆相 HPLC カラム (150 \times 4.6 mm I. d., Ultron 300 C₄: Chromatopacking Center) にかけて、1-40% の CH₃CN 濃度勾配
10 で溶出した。次にカラムクロマトグラフィーで得たピーク画分を凍結乾燥した。改変分子 A および B の収量は、各々 78.7 μ g および 103.1 μ g であった。

4-4) タンパクの純度検定

- 15 精製標品の純度検定の目的で、C₁₈ 逆相 HPLC カラム (150 \times 4.6 mm i. d., ODS120T, Tosoh) にかけて、15-30% の CH₃CN 濃度勾配で溶出し、改変分子 A および B のピークパターンの単一性を確認した。両タンパクの純度は 94% 以上であることが分かった。

20 実施例 25

3T3 細胞を用いた細胞増殖促進活性の測定

- モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、8 巻、588 頁、1988 年に記載の方法に準じ、静止状態の 3T3 A31-714 クローン 4 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、12 巻、463 頁、1973 年) 中への
25 の ³H-チミジンの取り込みによって細胞増殖促進活性を測定した。

5% ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグル MEM 培地を用いて、1000 細胞/mL になるように懸濁した 3T3 A31-714 クローン 4 を 96 ウェルプレートに 100 μ L ずつ播き、炭酸ガスインキュベーター内 (5% 炭酸ガス、95% 空気) において 37℃ で 1 日培養した。上清 75 μ L を抜き取り、血清を

含まないダルベッコ改変イーグルMEM培地を100 μ L加えることにより血清濃度を1%にした。さらに2日間培養した後、種々の濃度の上記の実施例で調製したhBTC50、改変分子Aまたは改変分子Bを添加した。添加16時間後に³H-チミジン [アマーシャム・ファルマシア・バイオテック] を0.25 μ Ci/well加え、その4時間後に細胞をPBSで3回洗浄した後、5% SDSを100 μ L加え細胞を溶解した。細胞溶解液をシンチレーションバイアルに移し、シンチレーターA (和光純薬社) を1mL加え、シンチレーションカウンターで³H-チミジンの細胞への取り込みを測定した。

この測定結果より、80残基型ベータセルリン (標準品) の最大取り込み値を100%として、50%の活性を示した時のhBTC50および改変分子の濃度 (ED₅₀) を求めた結果を [表15] に示す。

〔表15〕 細胞増殖促進活性

サンプル	ED ₅₀ (nM)
hBTC50	0.01
改変分子A	0.6
改変分子B	>10.0

15

実施例26

AR42J細胞を用いた β 細胞分化誘導活性の測定

上記で調製したhBTC50、改変分子A、改変分子Bおよび特開平10-191989号に記載の方法により調製した80残基型ベータセルリン (hBTC80) から選ばれる1種と、10% ウシ胎児血清とを含むダルベッコ改変イーグルMEM培地に、化学発癌剤で誘発された膵臓癌由来細胞株AR42J [Christophe; アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギー (Am. J. Physiol.), 266巻、G963頁、1994年] を10⁵細胞/mLになるように懸濁し、500 μ Lをチャンバースライドに播き、炭酸ガスインキュベーター内 (5% 炭酸ガス、95% 空気) において37℃で5日間培養した。5日後に細胞をPBSで1回洗浄した後に、10% ホルムアルデヒドで固定し、0.1% トリトンX

25

ー 1 0 0 で 5 分間処理した後に、ブロッケーヌ（雪印、日本）を添加し、室温で 4 0 分間ブロッキングを行った。1 0 % ブロッケーヌで希釈した抗インスリン抗体（アドバンスド・イムノ・ケミカル社）を添加し室温、4 0 分間反応した。0. 1 % トリトン X-1 0 0 を添加し室温 5 分間放置した後、P B S で 3 回洗浄した。1 0 % ブロッケーヌで希釈した F I T C (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗マウス I g G 抗体（カッペル社）を添加し、室温で 4 0 分間反応した。0. 1 % トリトン X-1 0 0 を添加し室温 5 分間放置した後、P B S で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、h B T C 8 0 を添加した場合と同様に、h B T C 5 0、改変分子 A および改変分子 B を添加した場合においても、蛍光染色された細胞、すなわちインスリンを産生する β 細胞に分化した細胞が観察された。

また、インスリン産生細胞の出現頻度は、h B T C 8 0、h B T C 5 0、改変分子 A および改変分子 B 間で差が見られなかった。

実施例 2 7

P L A P 発現 A R 4 2 J 細胞を用いた β 細胞分化誘導活性の測定

3-1) ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ遺伝子発現ベクターの構築

β 細胞への分化促進活性はインスリンプロモーターの下流にレポーターとしてアルカリフォスファターゼ遺伝子を連結したものにより形質転換された A R 4 2 J 細胞を用いても実施した。すなわちベクターセルリンにより β 細胞へと分化した細胞はアルカリフォスファターゼを産生し、このアルカリフォスファターゼの活性を測定することにより β 細胞への分化促進活性を定量的に測定することが可能である。

ラット尾から常法に従ってゲノム DNA を調製した。この DNA をテンプレートとして、既報のラットインスリン I I 遺伝子プロモーターの塩基配列 (GenBank: Accession No. J00748) をもとに合成したプライマー R I-1 : 5' -AGAGTCAAGGATCCCCCAACCACT-3' およびプライマー R I-3 : 5' -AGCTGGTCACTTAGGGCTGGGG-3' を用いて P C R 法によりインスリンプロモーター領域 0. 7 5 K b を増幅した。さらに、

このPCR産物をテンプレートとしてプライマーR I - 1 C l a : 5' - G A A T
C G A T A G A G T C A A G G A T C C C C C A - 3' およびプライマーR I -
3 X h o : 5' - G A C T C G A G C T G G T C A C T T A G G G - 3' を用いて
PCRを行った。増幅された0.75 Kb DNA断片を単離し、p T 7 B l u
e ベクター (Novagen 69820-1) に組み込んで得られたプラスミドp T B 1 8 8 1
を用いてクローニングされた断片の塩基配列を決定し、ラットインスリンI I プ
ロモーターであることを確認した。プラスミドp T B 1 8 8 1をX h o I - C l a
Iで切断してラットインスリンプロモーターである0.73 kb DNA断片
を得た。次にヒト胎盤アルカリフォスファターゼ (P L A P) をコードする2.
0 kb cDNA (J. Berger ら、Gene 66, 1(1988)) の発現プラスミドp T B
1 3 3 0をX h o I - H i n d I I Iで切断して得られた2.7 kb DNA断
片 (P L A P cDNA、SV40由来スプライシング部位およびポリA付加部
位、p B R 3 2 2由来o r iおよびアンピシリン耐性遺伝子を含む) を単離し、
前述のラットインシュリンプロモーター領域0.73 kb X h o I - C l a
I断片をT4 DNAリガーゼ反応によって連結してプラスミドp T B 1 8 9 8
を得た。

3-2) P L A P発現AR42J細胞の構築

AR42J細胞にP L A P発現プラスミドp T B 1 8 9 8とTn5のneo^r
遺伝子を含むプラスミドp M C n e o p o l y A (STRATAGENE) をトランスフ
ェクション試薬T r a n s I TTM-L T 1 (Mirus、PenVera Corporation) を用
いて同時に導入した。導入後の細胞は10%牛胎児血清を加えたD M E Mで2日
間培養した後、G 4 1 8 (ゲネチシン、GIBCO BRL) 800 μ g/mLを添加した
選択培地にかえて培養を続けた。G 4 1 8耐性となって生育した細胞を限界希釈
法によりクローンを単離した。

各クローンの細胞を24穴プレートに播き、80残基型B T Cを20 ng/mL
L添加および無添加で4日間培養し、培養上清を集めて65℃、30分間熱処理
を行った後、培地中のアルカリフォスファターゼ活性を測定した。80残基型ベ
ータセルリン添加時にアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められるクロー
ンを選択し、その中の1クローンAR71-104を以下の検討に用いた。

3-3) PLAP発現AR42J細胞を用いた β 細胞分化誘導活性の測定

各種濃度の上記で調製したhBTC50、改変型分子Aおよび改変型分子Bから選ばれる1種と、10%ウシ胎児血清とを含むダルベッコ改変イーグルMEM培地に、上記3-2)で構築したPLAP発現AR42J細胞を 3×10^4 細胞/mLになるように懸濁し、100 μ Lを96ウェルプレートに播き、炭酸ガスインキュベーター内(5% 炭酸ガス、95%空気)において37℃で5日間培養した。5日後に培養上清をサンプリングし、65℃で30分間処理した後、50 μ Lをあらかじめ50 μ Lの2XSEAP(2M ジエタノールアミン、1mM MgCl₂、20mM ホモアルギニン)を添加した96ウェルマイクロプレートに加えた。37℃で10分間保った後、20mg/mLのp-ニトロフェニルリン酸(シグマ社)を10 μ L添加し37℃で16時間反応を行い、405nmの吸光度A₄₀₅を測定した。

hBTC50添加時の最大吸光度を100%とした際の50%の活性を示すのに必要なタンパク濃度(ED₅₀)を〔表16〕に示す。

〔表16〕 β 細胞への分化誘導活性

サンプル	ED ₅₀ (nM)
hBTC50	0.15
改変分子A	0.5
改変分子B	0.7

参考例1

50残基型ヒトベータセルリン(hBTC50)発現プラスミドpTB1976の構築

80残基型hBTC cDNAを組み込んだプラスミドpTB1516(特開平6-87894号公報記載;受託番号FERM BP-3836, 受託番号IFO15282)をテンプレートとして、プライマーBT-95h: 5'-AGCATATGCGGAAAGGCCACTTCTCTAGGT-3'およびBT-94h: 5'-CTGGATCCTAGTAAAACAAGTCAACTCTCT-3

を用いてPCRを行った。hBTCのC末50残基型の5'末端に翻訳開始コドンおよびNdeIサイトを、3'末端に終止コドンおよびBamHIサイトをそれぞれ挿入したPCR産物をNdeIおよびBamHIで消化し、T7ファージのΦ10プロモーターを保持する発現用プラスミドpET-3c(Novagen)のNdeI-BamHI部位にDNA Ligation Kit Ver. 2(Takara)を用いて組み込み、hBTC50の発現プラスミドpTB1976を作製した。組み込んだcDNAの塩基配列はABI社のDNAシーケンサー(ABI377 DNA Sequencer)により確認した。

プラスミドpTB1976の構築の概略を〔図10〕に示す。

10

産業上の利用可能性

本発明のベータセルリンムテインまたはその塩は、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱されており、抗原性の問題もないことから、優れた糖尿病治療薬として有用である。

15

請求の範囲

1. 膵臓 β 細胞の分化促進活性が保持され、上皮細胞増殖促進活性が低減されたベータセルリンムテインまたはその塩。
- 5 2. 上皮細胞増殖促進活性に対する膵臓 β 細胞の分化促進活性の比が、ベータセルリンのそれに比べて2倍以上である請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
3. ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基L e uもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基A s pを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換された請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
- 10 4. N末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失した請求項3記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
- 15 5. ①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：2で表されるアミノ酸配列または④配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を含有する請求項3記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
- 20 6. ①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：2で表されるアミノ酸配列、③配列番号：3で表されるアミノ酸配列または④配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有する請求項3記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
7. ①配列番号：37で表されるアミノ酸配列または②配列番号：38で表されるアミノ酸配列を含有する請求項3記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
- 25 8. ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入された請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩。
9. ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失した請求項8

記載のベータセルリンムテインまたはその塩。

10. 配列番号：44で表されるアミノ酸配列を有する請求項8記載のベータセルリンムテインまたはその塩。

5 11. 配列番号：45で表されるアミノ酸配列を有する請求項8記載のベータセルリンムテインまたはその塩。

12. 請求項1記載のベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ベータセルリンムテインを生成せしめることを特徴とする請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩の製造法。

10 13. 請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩を含有してなる医薬組成物。

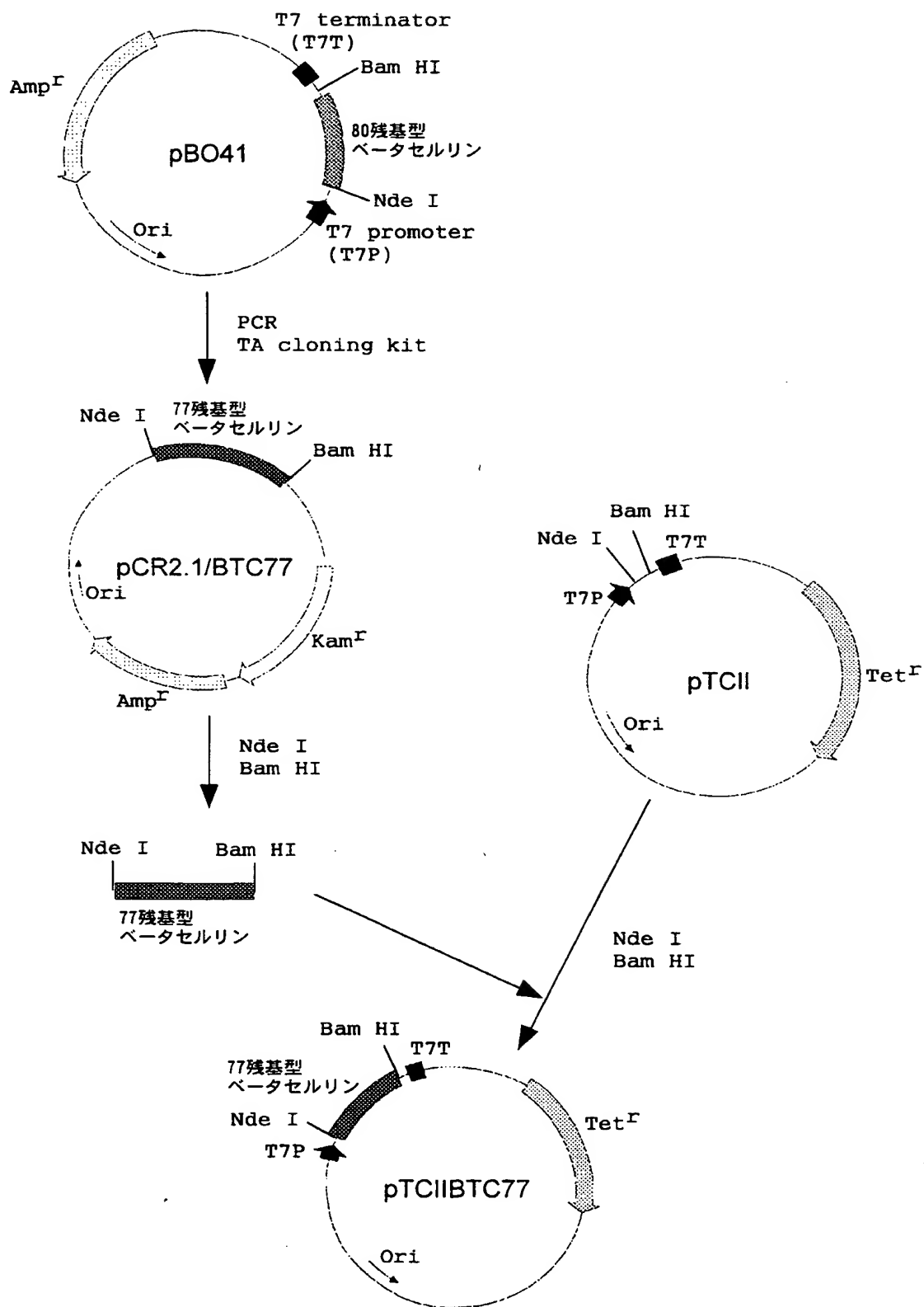
14. 組成物が糖尿病予防・治療薬である請求項9記載の医薬組成物。

15. 請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とする糖尿病予防・治療法。

15 16. 糖尿病予防・治療剤の製造のための請求項1記載のベータセルリンムテインまたはその塩の使用。

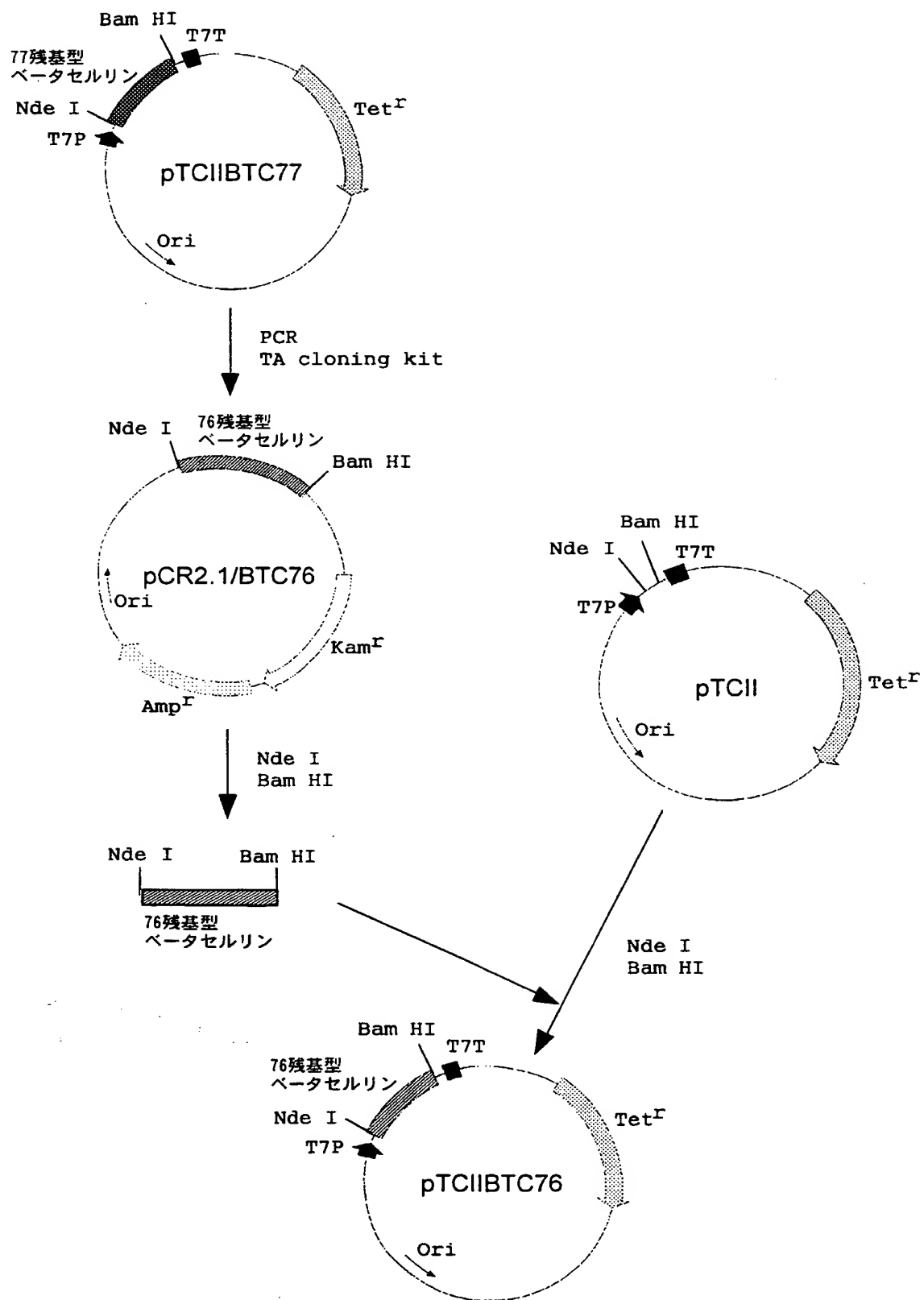
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

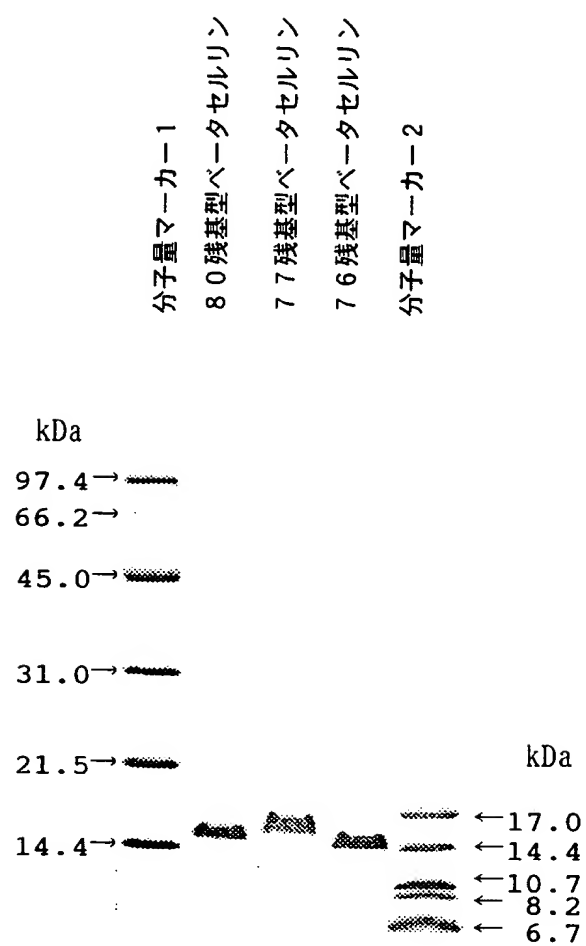
図2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

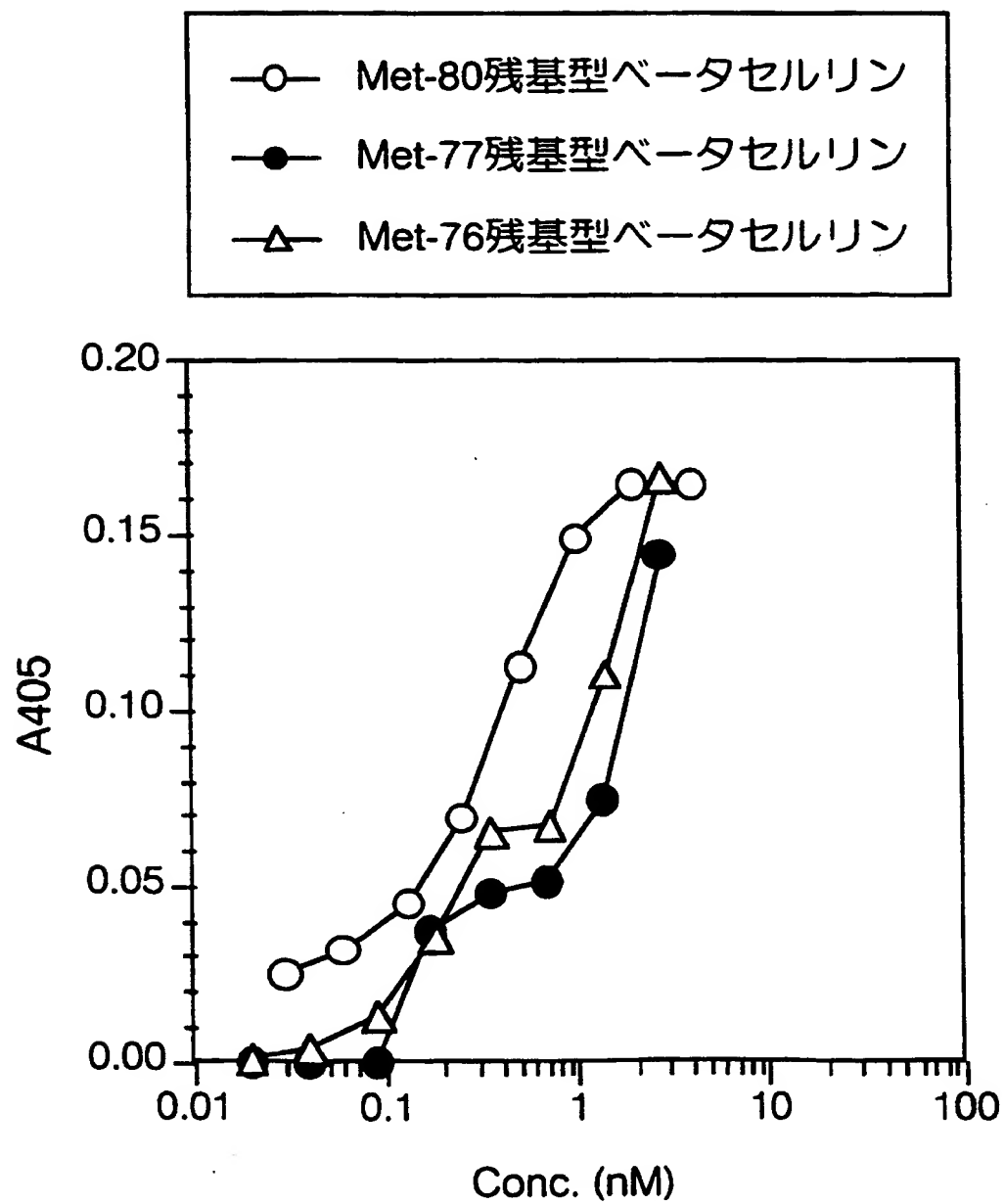
3/10

図3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

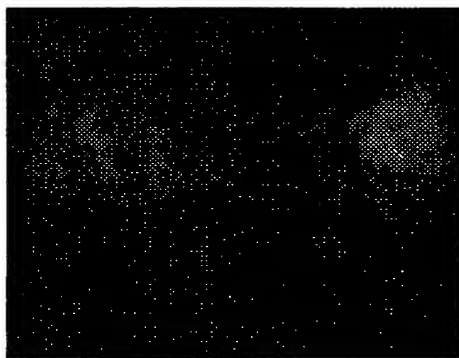
図4



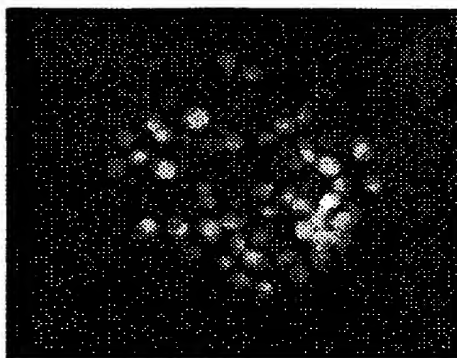


THIS PAGE BLANK (USPTO)

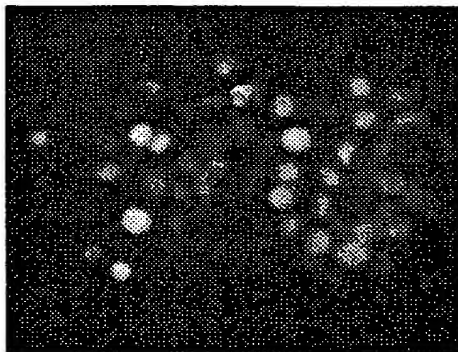
図5



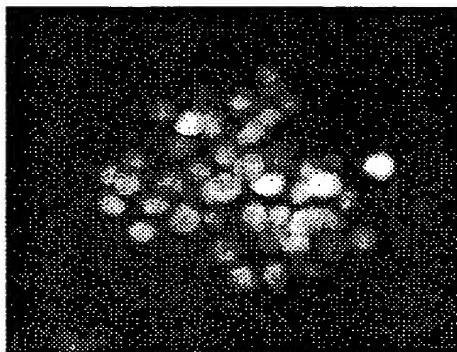
ベータセルリン無添加



Met-80残基型ベータセルリン



Met-77残基型ベータセルリン

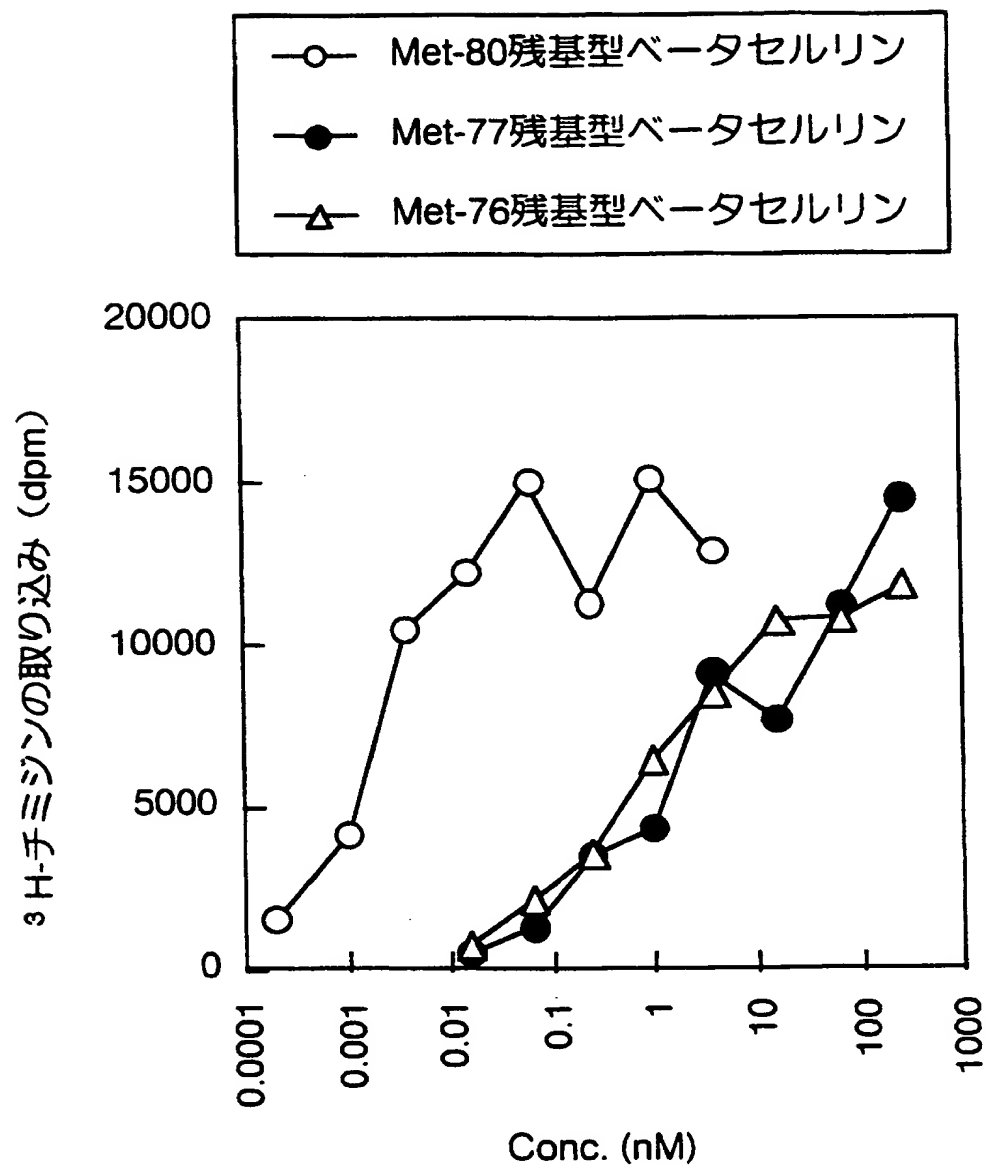


Met-76残基型ベータセルリン



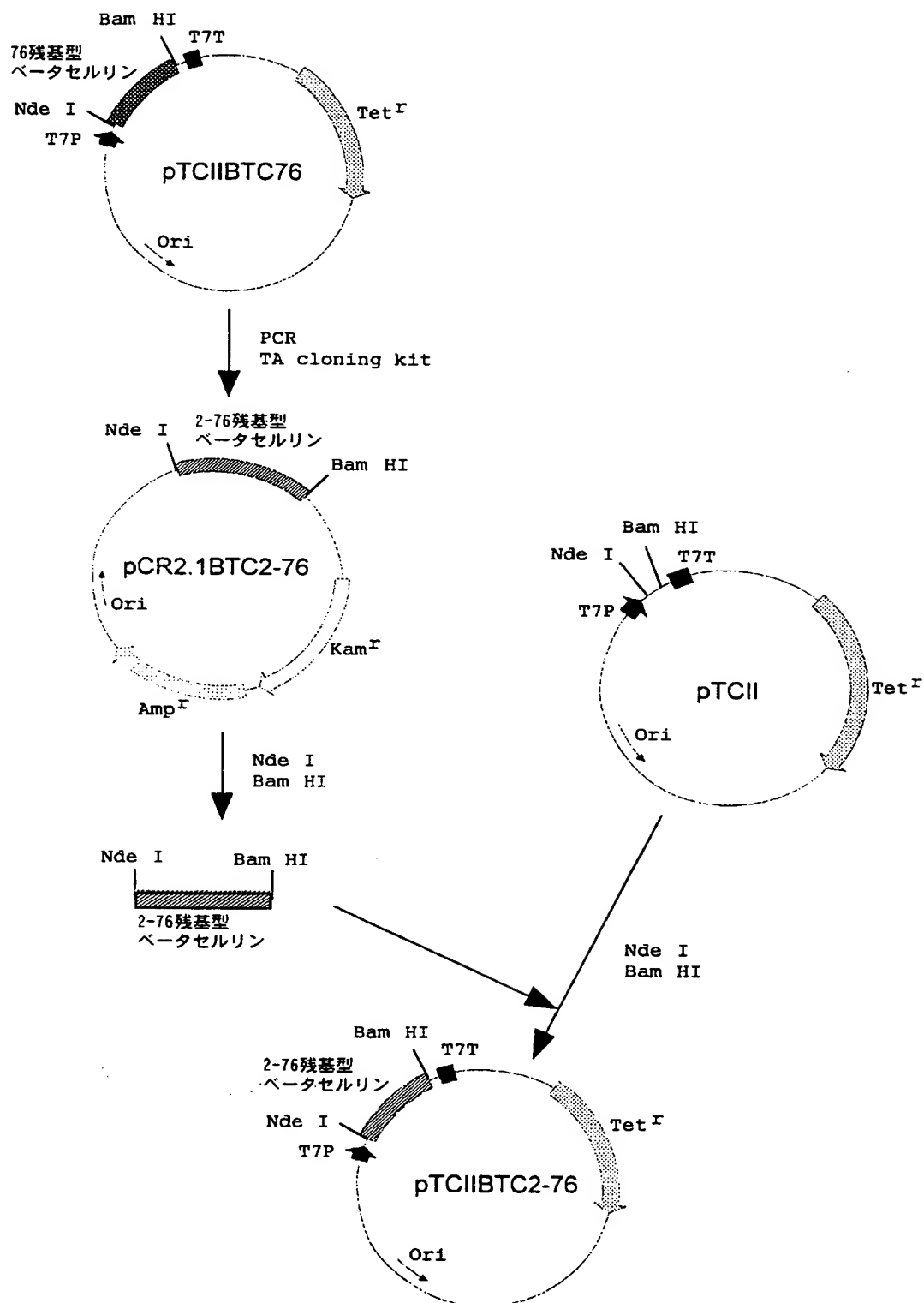
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図6



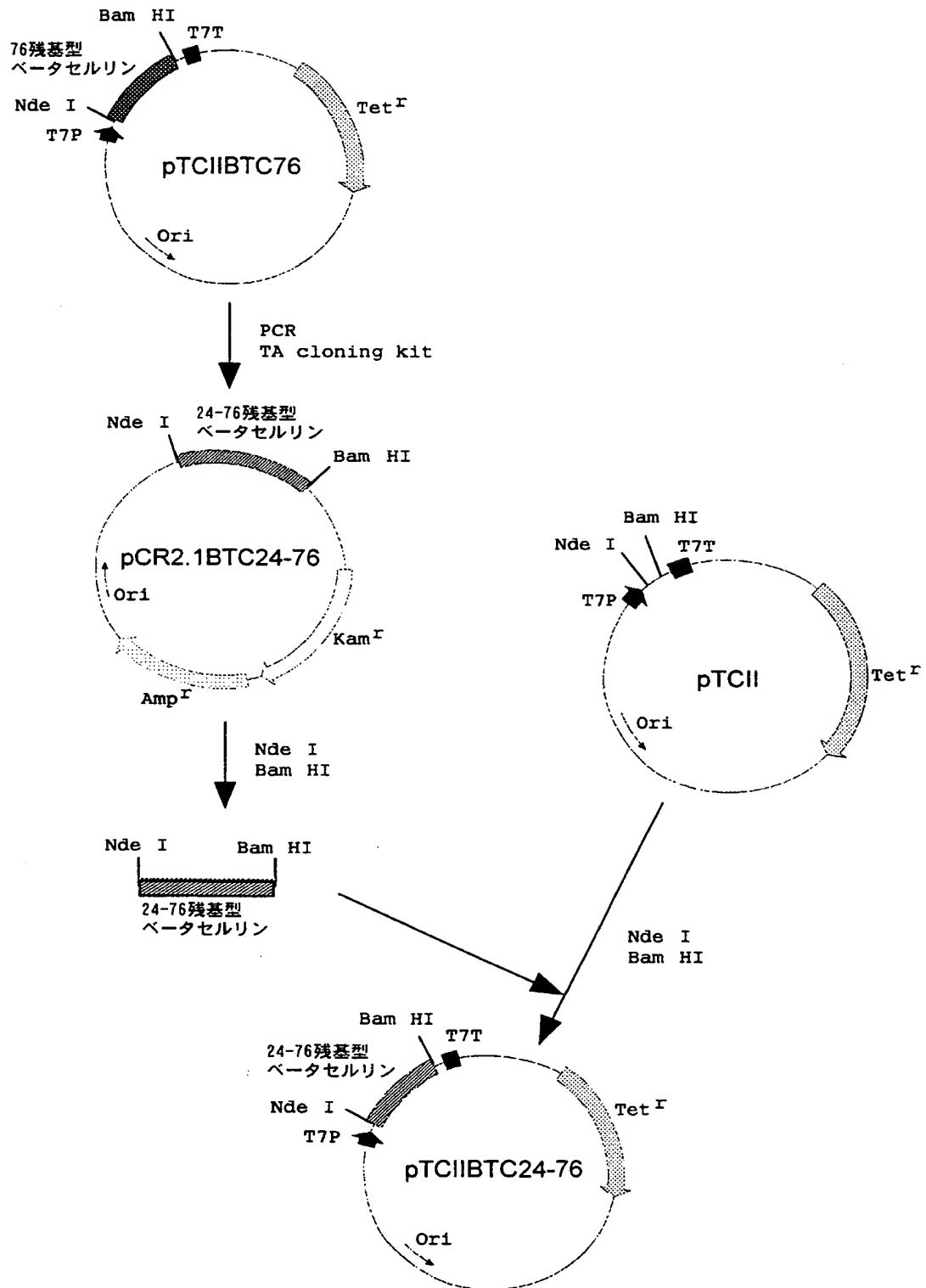
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図7



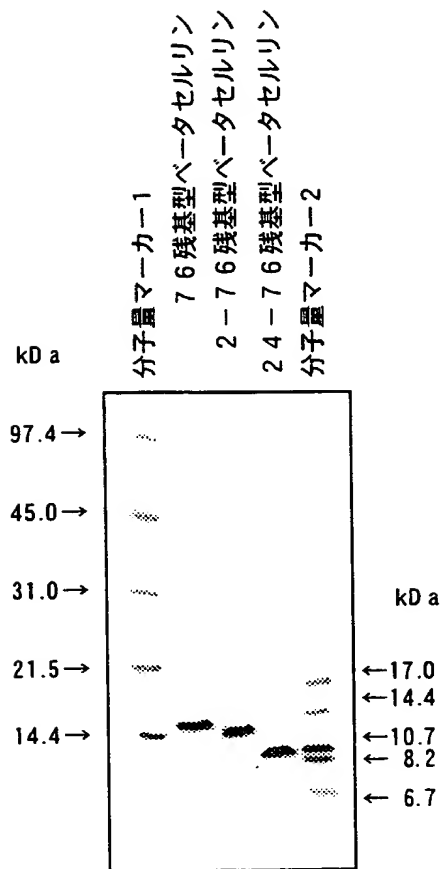
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図8



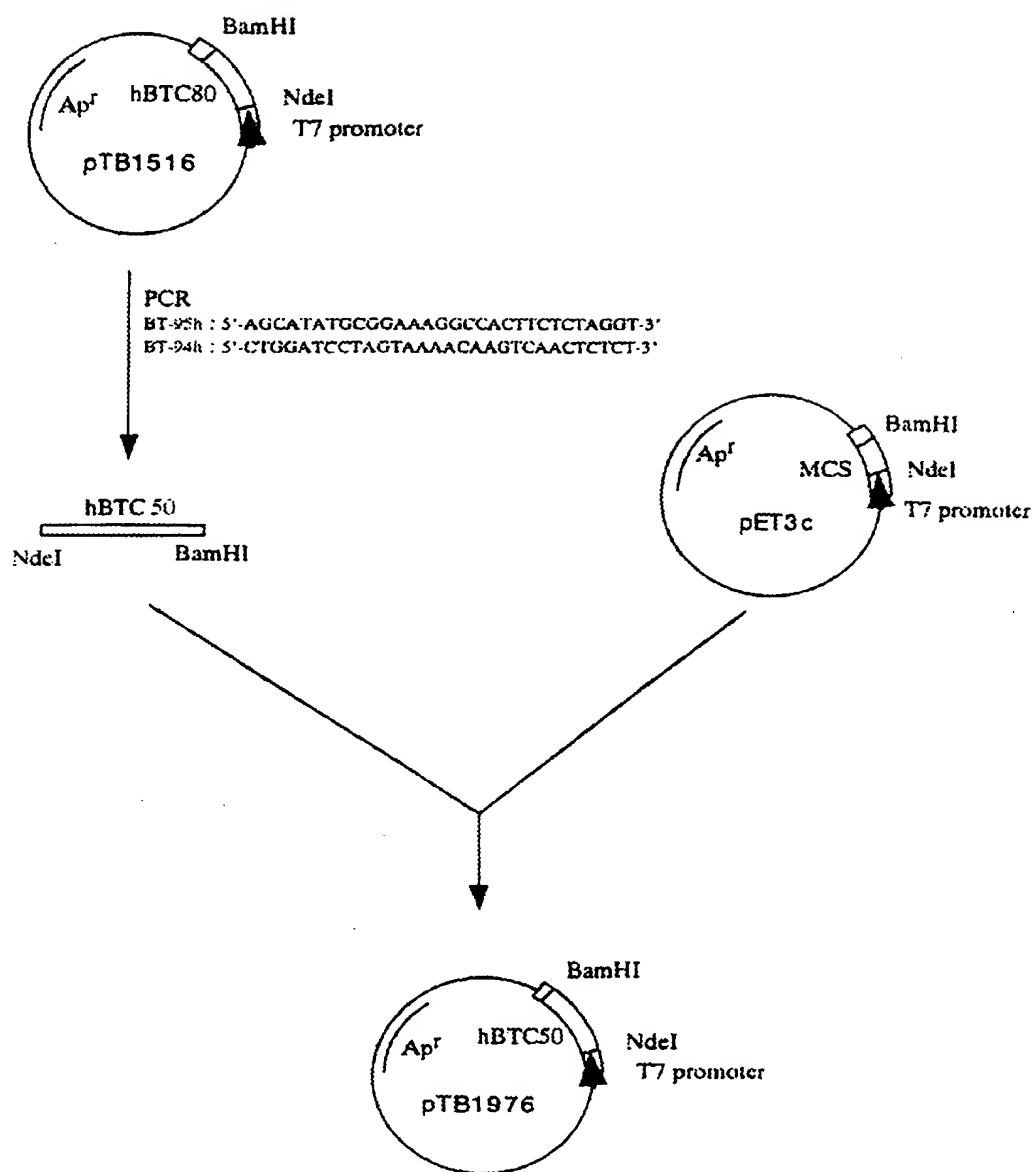
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Betacellulin Mutein

<130> 2576W00P

<150> JP 10-350377

<151> 1998-12-09

<150> JP 11-55326

<151> 1999-03-03

<160> 56

<210> 1

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp

65 70 75

<210> 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/22

<211> 76

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val

65 70 75

<210> 3

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp

35 40 45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/22

<210> 4

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 4

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val

35 40 45

<210> 5

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/22

65 70 75

<210> 6

<211> 78

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 6

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe

65 70 75

<210> 7

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 7

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/22

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35

40

45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50

55

60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu

65

70

75

<210> 8

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20

25

30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35

40

45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50

55

60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe Tyr

65

70

75

<210> 9

<211> 78

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/22

<400> 9

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe

65 70 75

<210> 10

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe

35 40 45

Tyr

<210> 11

<211> 48

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 11

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe

35 40 45

<210> 12

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 12

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu

35 40 45

<210> 13

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 13

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/22

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe

35 40 45

Tyr

<210> 14

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe

35 40 45

<210> 15

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60

AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/22

CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180

TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA C 231

<210> 16

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60

AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120

CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180

TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTT 228

<210> 17

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60

TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120

GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA C 141

<210> 18

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/22

TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTT 138

<210> 19

<211> 237

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTTTAC 237

<210> 20

<211> 234

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTT 234

<210> 21

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/22

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT G 231

<210> 22

<211> 237

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTTAC 237

<210> 23

<211> 234

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTT 234

<210> 24

<211> 147

<212> DNA



THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/22

<213> Artificial Sequence

<400> 24

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTTTAC 147

<210> 25

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTT 144

<210> 26

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT G 141

<210> 27

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/22

<400> 27

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTTAC 147

<210> 28

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTT 144

<210> 29

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

CATATGGATG GGAATTCCAC CAGAAGTCCT G 31

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

GGATCCCTAG TCAACTCTCT CACACCTTGC TCC 33

<210> 31

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

AGAGTCAAGG ATCCCCCAAC CACT

24

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

AGCTGGTCAC TTAGGGCTGG GG

22

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

GAATCGATAG AGTCAAGGAT CCCCCA

26

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

GACTCGAGCT GGTCACCTTAG GG

22

<210> 35

<211> 80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/22

<212> PRT

<213> Human

<400> 35

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20

25

30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35

40

45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50

55

60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

65

70

75

80

<210> 36

<211> 240

<212> DNA

<213> Human

<400> 36

GATGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60

AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120

CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180

TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTGTTTTAC 240

<210> 37

<211> 75

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16/22

<400> 37

Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pto Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp

1 5 10 15

Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly

20 25 30

His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly

35 40 45

Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp

50 55 60

Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val

65 70 75

<210> 38

<211> 53

<213> Artificial Sequence

<400> 38

Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro

1 5 10 15

Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val

20 25 30

Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala

35 40 45

Arg Cys Glu Arg Val

50 53

<210> 39

<211> 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

CAGCATATGG GGAATTCCAC CAGAAGTCCT 30

<210> 40

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

GGATCCCTAA ACTCTCTCAC ACCTTGCTCC AATG 34

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

CAGCATATGG CTACCACCAC ACAATCAAAG 30

<210> 42

<211> 225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

GGGAATTCCA CCAGAAGTCC TGAAACTAAT GGCCTCCTCT GTGGAGACCC TGAGGAAAAC 60

TGTGCAGCTA CCACCACACA ATCAAAGCGG AAAGGCCACT TCTCTAGGTG CCCCAGCAA 120

TACAAGCATT ACTGCATCAA AGGGAGATGC CGCTTCGTGG TGGCCGAGCA GACGCCCTCC 180

TGTGTCTGTG ATGAAGGCTA CATTGGAGCA AGGTGTGAGA GAGTT 225

18/22

<210> 43

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 43

GCTACCACCA CACAATCAAA GCGGAAAGGC CACTTCTCTA GGTGCCCCAA GCAATACAAG 60
CATTACTGCA TCAAAGGGAG ATGCCGCTTC GTGGTGGCCG AGCAGACGCC CTCCTGTGTC 120
TGTGATGAAG GCTACATTGG AGCAAGGTGT GAGAGAGTT 159

<210> 44

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 44

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
5 10 15
Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr
20 25 30
Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg
35 40 45
Val Asp Leu Phe Tyr
50

<210> 45

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19/22

<400> 45

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

5

10

15

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

20

25

30

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

35

40

45

<210> 46

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 46

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20

25

30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35

40

45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser

50

55

60

Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp

65

70

75

80

Leu Phe Tyr

<210> 47

<211> 249

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20/22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 47

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGAACCCC 180
TCGACGCCCT CCTGTGTCTG TGATGAAGGC TACATTGGAG CAAGGTGTGA GAGAGTTGAC 240
TTGTTTTAC 249

<210> 48

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 48

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGAACCCC TCGACGCCCT CCTGTGTCTG TGATGAAGGC 120
TACATTGGAG CAAGGTGTGA GAGAGTTGAC TTGTTTTAC 159

<210> 49

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 49

AACAGCGACT CTGAGTGCCC CAAGCAATAC AAGCATTACT GCATCAAAGG GAGATGCCGC 60
TTCGTGGTGG CCGAGCAGAC GCCCTCCTGT GTCTGTGATG AAGGCTACAT TGGAGCAAGG 120
TGTGAGAGAG TTGACTTGTT TTAC 144

<210> 50

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 50

AGCATATGCG GAAAGGCCAC TTCTCTAGGT

30

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 51

CTGGATCCTA GTAAAACAAG TCAACTCTCT

30

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 52

GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG

30

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 53

AGGAGGGCGT CGAGGGGTTC TGCTCGGCCA

30

<210> 54

<211> 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 54

TGGCCGAGCA GAACCCCTCG ACGCCCTCCT

30

<210> 55

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 55

TCTATGCGCA CCCGTTCTCG GAGCACTGTC

30

<210> 56

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 56

TATACATATG AACAGCGACT CTGAGTGCCC CAAGC

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C1N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C1N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
JICST (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Reiko Sasaki, et al., "Betacellulin: Atarashii Kekkan Heikatsukin Saibo Seicho Inshi", Nippon Rinsho (1993), Vol.51, No.12, p.3308-3317	1-14,16
Y	Sasada, R. et al. "Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1993), Vol.190, No.3, p.1173-1179	1-14,16
Y	Shing, Y. et al. "Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors" Science (1993), Vol.259, No.5101, p.1604-1607	1-14,16
Y	Cook, P.W. et al. "Carboxyl-terminal truncation of leucine ⁷⁶ converts heparin-binding EGF-like growth factor from a heparin-enhancible to a heparin-suppressible growth factor" J. Cell. Physiol. (1995), Vol.163, No.2, p.407-417	1-14,16
Y	Johnson, G.R. et al. "Characterization of high and low molecular weight forms of amphiregulin that differ in glycosylation and peptide core length. Evidence that the	1-14,16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 March, 2000 (03.03.00)

Date of mailing of the international search report
14 March, 2000 (14.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06873

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	NH2-terminal region is not critical for bioactivity" J.Biol.Chem. (1993), Vol.268. No.25, p.18835-18843	
Y	Kojima, I. et al. "Differentiation of pancreatic endocrine cells" Diabetes J. (1998, Sep.), Vol.26, No.3, p.97-103	1-14, 16
Y	Watanabe, T. et al. "Recombinant Human Betacellulin" J.Biol.Chem. (1994), Vol.269, No.13, p.9966-9973	1-14, 16
A	Shin, S.Y. et al. "The chemical synthesis and biological activity of EGF-like domain of betacellulin, a new member of EGF family" Peptide Chemistry (1994), Vol.1993, p.225-228	1-14, 16
A	Mixan, B. et al. "Betacellulin-Pseudomonas toxin fusion proteins bind but are not cytotoxic to cells expressing HER4; correlation of EGFR for cytotoxic activity" Oncogene (1998, Mar.), Vol.16, No.9, p.1209-1215	1-14, 16
A	JP, 6-87894, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 26 March, 1994 (26.03.94) & EP, 555785, A1 & CA, 2089111, A & EP, 555785, B1 & DE, 69306273, A & ES, 2099304, A & US, 5886141, A	1-14, 16
A	JP, 10-191989, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 July, 1998 (28.07.98) (Family: none)	1-14, 16
A	K. Miyasono, et al., "Jikken Igaku Bessatsu, BioScience, Yogo Library Saitikain Zoshoku Inshi", Kabushiki Kaisha Yodosha (01.05.1997), p.92-93	1-14, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06873

B x I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Invention as set forth in claim 15 pertains to methods for prevention or treatment of diabetes by administering a betacellulin mutein or its salt to mammals and substantially corresponds to methods for treatment of the human body by therapy. Therefore, it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G・M	Pat・M	部長
特許協力条約			

Docket No. 46342/55965

14

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人
高橋 秀一

00.7.30

あて名

〒 532-0024
大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社 知的財産部

殿

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

受付

00.6.-1

知的財産部

発送日
(日.月.年)

30.05.00

出願人又は代理人
の書類記号

2576WOOP

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P 99/06873

国際出願日

(日.月.年)

08.12.99

優先日

(日.月.年)

09.12.98

国際特許分類 (IPC)

Int. C1' C12N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎II ☐ 優先権III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合にに限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。

補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

回答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 09.04.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4 N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/408 (表紙) (1998年7月)

(添付用紙の注意書きを参照)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. 次に、次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- ☒ 請求の範囲 15

☒ この国際出願又は請求の範囲 15 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 15 は、ベータセルリンムテインまたはその塩を哺乳動物に投与する糖尿病予防・治療法に係る発明であり、実質的にヒトの治療方法に該当するから、PCT 17 条(2)(a)(i)及びPCT 規則 39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- | | | |
|---|----|-----------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 | 15 | について、国際調査報告が作成されていない。 |
|---|----|-----------------------|

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、見解書を作成することができない。

- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-14, 16	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-14, 16	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-14, 16	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲 1-14, 16

文献1：日本臨床 (1993) 第51巻 第12号 p. 3308-3317

には、マウス及びヒト由来のベータセルリンをコードする cDNA の塩基配列及び推定アミノ酸配列が記載されており、ベータセルリンの前駆体は TGF- α のそれとよく似た構造的特徴を有し、HSC-1 細胞の増殖に及ぼす作用も EGF や TGF- α とよく似ていることが記載されている。

文献2：J. Biol. Chem. 268 [25] (1993) p. 18835-18843

には、ヒトアンフィレグリン (AR) の N 末端領域は、AR の EGF チロシンキナーゼ活性に影響を与えないことが記載されている。

文献3：J. Cel. Physiol. 163 [2] (1995) p. 407-417

には、EGF 及び TGF- α の C 末端領域に存在する保存されたロイシンを変異させると、EGF レセプターに対する親和性を減少することが記載されている。

してみると、文献3の記載に基づいて、C 末側に存在する保存性ロイシンを変異させれば、EGF 活性を減少できることが予想されるから、文献1記載の発明において、EGF 活性を低減したベータセルリンを得るために、成熟ベータセルリンの78番目のロイシンに対して変異を起こさせようとすることは、当業者が容易に想到し得ることである。その際、前記変異として、78番目付近まで C 末端を欠失させることや、78番目のロイシン周辺を欠失させることも、当業者が容易に適宜なし得ることである。一方、文献2によれば、N 末端領域の欠失は EGF 活性に影響を与えないと一見予想されるが、文献3には、前記ロイシンの存在が AR と HB-EGF の EGF 活性における挙動に全く逆の影響を与えることが記載されているから、ベータセルリンが HB-EGF と同様に、該保存性ロイシンを有することを考慮すれば、文献2に記載された AR とは全く逆に、N 末端を欠失させれば EGF 活性を低減できるかもしれないと予想することは当業者が十分できると考える。してみれば、ベータセルリンの EGF 活性が減少することを期待して、ベータセルリンの N 末端領域を欠失させてみようとすることも、当業者が容易に想到し得ることであると認める。そして、このようにして得られた EGF 活性が低減されたベータセルリンを医薬組成物として使用することは、当業者が容易に想到し得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G・M	Pat・M	部長
		特許	

Docket No. 46342/55965

協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

P C T

国際予備審査請求書受付
の受理通知書

00.2.-2

知的財産部

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

PCT/JP99/06873

PE402

発送日（日．月．年）

01.02.00

出願人又は代理人

の書類記号

2576WOOP

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06873

国際出願日（日．月．年）

08.12.99

優先日（日．月．年）

09.12.98

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

24 日 01 月 00 年

2. この受理の日は次に示す日である。

☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）

☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）

☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日
3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

担当者	G・M	Pat・M	部長
			P

C T



出願人代理人

高橋 秀一

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

殿

調査用写しの受理通知書

(法施行規則第39条)
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP99/06873

SA202

発送日（日．月．年）

11.01.00

出願人又は代理人
の書類記号

2576WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP99/06873

国際出願日（日．月．年）

08.12.99

優先日（日．月．年）

09.12.98

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

11 日 01 月 00 年（受理の日）2. ☐ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

高橋 秀一

担当者	G・M		Pat・M	部長

あて名

〒532-0000

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP99/06873

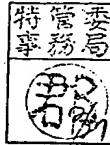
RO105

P C T

受付

99.12.24

知的財産部



2000年(4.13.14)付(可)

に(新)改。

国際出願番号及び
国際出願日の通知書(法施行規則第22条、第23条)
〔PCT規則20.5(c)〕

発送日(日.月.年)

21.12.99

出願人又は代理人
の書類記号

2576WOOP

国際出願番号

PCT/JP99/06873

国際出願日(日.月.年)

08.12.99

重 要 な 通 知

優先日(日.月.年)

09.12.98

出願人(氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、21日12月99年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁 (RO/JP)

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105 (1998年7月)

権限のある職員

特許庁長官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G-M	Pat-M	部長
-----	-----	-------	----

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 2576WO0P			
International application No. PCT/JP99/06873	International filing date (day/month/year) 08 December 1999 (08.12.99)	Priority date (day/month/year) 09 December 1998 (09.12.98)	
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KG,
KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,
UA,UZ,VN,YU,ZA
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
15 June 2000 (15.06.00) under No. WO 00/34478

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 17 January 2000 (17.01.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2576WOOP	International application No. PCT/JP99/06873

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)
ITO, Takashi et al (for US)

International filing date : 08 December 1999 (08.12.99)
Priority date(s) claimed : 09 December 1998 (09.12.98)
03 March 1999 (03.03.99)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 05 January 2000 (05.01.00)

List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AL,AM,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,
IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,
TR,TT,TZ,UA,US,UZ,VN,YU,ZA

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

Shinji IGARASHI

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

EP

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 2576WO0P	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/06873	国際出願日 (日.月.年) 08.12.99	優先日 (日.月.年) 09.12.98	
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲15は、ベータセルリンムテインまたはその塩を哺乳動物に投与する糖尿病予防・治療法に係る発明であり、実質的にヒトの治療方法に該当するから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C1N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C1N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
JICSTファイル (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	佐々田玲子ら著「ベータセルリン：新しい血管平滑筋細胞成長因子」日本臨床 (1993) 第51巻 第12号 p.3308-3317	1-14, 16
Y	Sasada, R. et al. "Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1993) 第190巻 第3号 p.1173-1179	1-14, 16
Y	Shing, Y. et al. "Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors" Science (1993) 第259巻 第5101号 p.1604-1607	1-14, 16

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.03.00

国際調査報告の発送日

14.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Cook, P. W. et al. "Carboxyl-terminal truncation of leucine76 converts heparin-binding EGF-like growth factor from a heparin-enhancible to a heparin-suppressible growth factor" J. Cell. Physiol. (1995) 第163巻 第2号 p. 407-417	1-14, 16
Y	Johnson, G. R. et al. "Characterization of high and low molecular weight forms of amphiregulin that differ in glycosylation and peptide core length. Evidence that the NH2-terminal region is not critical for bioactivity" J. Biol. Chem. (1993) 第268巻 第25号 p. 18835-18843	1-14, 16
Y	Kojima, I. et al. "Differentiation of pancreatic endocrine cells" Diabetes J. (1998, Sep.) 第26巻 第3号 p. 97-103	1-14, 16
Y	Watanabe, T. et al. "Recombinant Human Betacellulin" J. Biol. Chem. (1994) 第269巻 第13号 p. 9966-9973	1-14, 16
A	Shin, S. Y. et al. "The chemical synthesis and biological activity of EGF-like domain of betacellulin, a new member of EGF family" Peptide Chemistry (1994) 第1993巻 p. 225-228	1-14, 16
A	Mixan, B. et al. "Betacellulin-Pseudomonas toxin fusion proteins bind but are not cytotoxic to cells expressing HER4; correlation of EGFR for cytotoxic activity" Oncogene (1998, Mar.) 第16巻 第9号 p. 1209-1215	1-14, 16
A	JP, 6-87894, A (武田薬品工業株式会社) 26. 3月. 1994 (26. 03. 94) & EP, 555785, A1 & CA, 2089111, A & EP, 555785, B1 & DE, 69306273, A & ES, 2099304, A & US, 5886141, A	1-14, 16
A	JP, 10-191989, A (武田薬品工業株式会社) 28. 7月. 1998 (28. 07. 98) (ファミリーなし)	1-14, 16
A	宮園浩平ら編「実験医学別冊 BioScience用語ライブラリー サイトカイン・増殖因子」株式会社羊土社 (1997年5月1日) p. 92-93	1-14, 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year)
02 March 2000 (02.03.00)

Applicant's or agent's file reference
2576WO0P

International application No.
PCT/JP99/06873

International publication date (day/month/year)
Not yet published

International filing date (day/month/year)
08 December 1999 (08.12.99)

Priority date (day/month/year)
09 December 1998 (09.12.98)

Applicant

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al

IMPORTANT NOTIFICATION

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
09 Dec 1998 (09.12.98)	10/350377	JP	04 Febr 2000 (04.02.00)
03 Marc 1999 (03.03.99)	11/055326	JP	04 Febr 2000 (04.02.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Marc Salzman

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003142698

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 2576WO0P			
International application No. PCT/JP99/06873	International filing date (day/month/year) 08 December 1999 (08.12.99)	Priority date (day/month/year) 09 December 1998 (09.12.98)	
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
 EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
 National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
 OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
 National : AE, AL, AM, AZ, BA, BB, BY, CR, CU, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, KG, KZ, LC,
 LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MX, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UZ, VN, YU, ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/09/85 7615
Translation
5630

PATENT COOPERATION TREATY
PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2576WO0P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06873	International filing date (day/month/year) 08 December 1999 (08.12.99)	Priority date (day/month/year) 09 December 1998 (09.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/19, C12P 21/02, C07K 14/52, A61K 38/19		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 January 2000 (24.01.00)	Date of completion of this report 20 November 2000 (20.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP99/06873

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06873

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 15

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 15 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of Claim 15 is an invention concerning a method for the prevention and treatment of diabetes by administering a betacellulin mutein or its salt to mammals, and because this essentially corresponds to a method for treatment of the human body by therapy, it does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 15

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06873

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14,16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-14,16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14,16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Japanese Journal of Clinical Medicine, Vol. 51, No. 12, 1993, p. 3308-3317

Document 2: J. Biol. Chem. Vol. 268, No. 25, 1993, p. 18835-18843

Document 3: J. Cel. Physiol. Vol. 163, No. 2, 1995, p. 407-417

Claims 1-14 and 16

Based on the descriptions in documents 1-3 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 1-14 and 16 do not appear to involve an inventive step.

Document 1 describes the based sequences of cDNA that codes for murine and human betacellulin and its estimated amino acid sequences, and it states that a betacellulin precursor has structural characteristics that are very similar to those of TGF- α , and that its effect on the growth of HSC-1 cells is very similar to that of EGF and TGF- α . Document 2 states that the N-terminal region of human amphiregulin (AR) does not affect the EGF tyrosine kinase activity of AR. Document 3 states that when the conserved leucine at the C-terminal region of EGF and TGF- α is mutated, the affinity to the EGF receptor is decreased.

Therefore, because it can be predicted based on the description in document 3 that if the conserved leucine near the C-terminus is mutated, EGF activity can be reduced, persons skilled in the art can easily conceive of causing mutations in Leu 78 in mature betacellulin in order to obtain the betacellulin with decreased EGF activity in the invention described in document 1. In so doing, persons skilled in the art can delete the C-terminal region near Leu 78 or delete the region surrounding Leu 78 as needed for these mutations. On the other hand, according to document 2, deletion of the N-terminal region is expected to have no apparent effect on EGF activity, but document 3 states that the presence of the aforementioned leucine has opposite effects on the behavior of AR and HB-EGF with respect to EGF activity. Therefore, if we assume that betacellulin has this conserved leucine just like HB-EGF, persons skilled in the art can sufficiently predict that deletion of the N-terminal region may decrease EGF activity, which is exactly the opposite of the effect on AR that is described in document 2. Thus, this examination finds that persons skilled in the art can easily conceive of deleting the N-terminal region of betacellulin with the expectation of decreasing the EGF activity of betacellulin. Furthermore, persons skilled in the art can easily conceive of using the betacellulin with decreased EGF activity that was obtained in this manner as a medicinal composition.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 04 DEC 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 2576WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06873	国際出願日 (日.月.年) 08.12.99	優先日 (日.月.年) 09.12.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19		
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.01.00	国際予備審査報告を作成した日 20.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 引地 進	4 N 9549
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

III. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 15

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 15 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 15 は、ベータセルリンムテインまたはその塩を哺乳動物に投与する糖尿病予防・治療法に係る発明であり、実質的にヒトの治療方法に該当するから、PCT 17 条(2)(a)(i)及びPCT規則 39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 15 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書 C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-14, 16	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-14, 16	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-14, 16	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : 日本臨床 (1993) 第51巻 第12号 p. 3308-3317
 文献2 : J. Biol. Chem. 268 [25] (1993) p. 18835-18843
 文献3 : J. Cel. Physiol. 163 [2] (1995) p. 407-417

請求の範囲 1-14, 16

請求の範囲 1-14, 16 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1-3により、進歩性を有さない。

文献1には、マウス及びヒト由来のベータセルリンをコードするcDNAの塩基配列及び推定アミノ酸配列が記載されており、ベータセルリンの前駆体はTGF- α のそれとよく似た構造的特徴を有し、HSC-1細胞の増殖に及ぼす作用もEGFやTGF- α とよく似ていることが記載されており、文献2には、ヒトアンフィレグリン (AR) のN末端領域は、ARのEGFチロシンキナーゼ活性に影響を与えないことが記載されており、文献3には、EGF及びTGF- α のC末端領域に存在する保存されたロイシンを変異させると、EGFレセプターに対する親和性を減少することが記載されている。

してみると、文献3の記載に基づいて、C末側に存在する保存性ロイシンを変異させれば、EGF活性を減少できることが予想されるから、文献1記載の発明において、EGF活性を低減したベータセルリンを得るために、成熟ベータセルリンの78番目のロイシンに対して変異を起こさせようとすることは、当業者が容易に想到し得ることである。その際、前記変異として、78番目付近までC末端を欠失させることや、78番目のロイシン周辺を欠失させることも、当業者が容易に適宜なし得ることである。一方、文献2によれば、N末端領域の欠失はEGF活性に影響を与えないと一見予想されるが、文献3には、前記ロイシンの存在がARとHB-EGFのEGF活性における挙動に全く逆の影響を与えることが記載されているから、ベータセルリンがHB-EGFと同様に、該保存性ロイシンを有することを考慮すれば、文献2に記載されたARとは全く逆に、N末端を欠失させればEGF活性を低減できるかもしれないと予想することは当業者が十分できると考える。してみれば、ベータセルリンのEGF活性が減少することを期待して、ベータセルリンのN末端領域を欠失させてみようとすることも、当業者が容易に想到し得ることであると認める。そして、このようにして得られたEGF活性が低減されたベータセルリンを医薬組成物として使用することは、当業者が容易に想到し得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号

受理官庁記入欄

国際出願日

(受付印)

08.12.99

受領印

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

2576WO0P

第 I 欄 発明の名称

ベータセルリン改変体

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,

OSAKA 541-0045 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐

すべての指定国

☒

米国を除くすべての指定国

☐

米国のみ

☐

追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

伊藤 隆司 ITO Takashi

〒658-0032 日本国兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番地

101-2003号

10-101-2003, Koyochonaka 1-chome, Higashinada-ku, Kobe-shi,

HYOGO 658-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐

すべての指定国

☐

米国を除くすべての指定国

☒

米国のみ

☐

追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒

代理人

☐

共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,

OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

近藤 光代 KONDO Mitsuyo
〒565-0823 日本国大阪府吹田市津雲台5丁目18番D73-103号
18-D73-103, Tsukumodai 5-chome, Suita-shi, Osaka 565-0823
JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田中 葉子 TANAKA Yoko
〒610-0331 日本国京都府京田辺市田辺勇田80-50
80-50, Tanabeyuden, Kyotanabe-shi, KYOTO 610-0331 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

小林 昌行 KOBAYASHI Masayuki
〒666-0261 日本国兵庫県川辺郡猪名川町松尾台2丁目1番地
12 (E502)
1-12 E-502, Matsuodai 2-chome, Inagawa-cho, Kawabe-gun,
HYOGO 666-0261 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

五十嵐 貢一 IGARASHI Koichi
〒606-0802 日本国京都府京都市左京区下鴨宮崎町66番地の3
66-3, Shimogamo-miyazakicho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, KYOTO
606-0802 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

訂正
(00.0.0)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

佐々田 玲子 SASADA Reiko
〒617-0824 日本国京都府長岡京市天神4丁目6番8号
6-8, Tenjin 4-chome, Nagaokakyo-shi, KYOTO 617-0824 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

西村 紀 NISHIMURA Osamu
〒305-0812 日本国茨城県つくば市大字東平塚586番地2
586-2, Ooaza-higashihiratsuka, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0812 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域特許

- ☒ AP **ARIPO特許** : GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EA **ユーラシア特許** : AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EP **ヨーロッパ特許** : AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ OA **OAPI特許** : BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーズランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |
| <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- ☒ CR コスタリカ Costa Rica
☒ DM ドミニカ Dominica
☒ TZ タンザニア Tanzania
☒ MA モロッコ Morocco

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

追記欄

この追記欄を使用しないときは、この願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄.....の続き」(欄番号を表示する) と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。; 特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅵ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第VI欄 優先権主張

☐ の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 09. 12. 98	平成10年特許願 第350377号	日本国 Japan		
(2) 03. 03. 99	平成11年特許願 第055326号	日本国 Japan		
(3)				

☒ 上記 () の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る) のうち、次の () の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁 (日本国特許庁の長官) に対して請求している。

(1), (2)

* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

ISA/JP

先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会
(先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

第VIII欄 照合欄 ; 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 6 枚
明細書 (配列表を除く) 67 枚
請求の範囲 2 枚
要約書 1 枚
図面 10 枚
明細書の配列表 22 枚
合計 108 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
- ☐ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☐ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
- ☒ 別個の記名押印された委任状
- ☒ 包括委任状の写し
- ☐ 記名押印 (署名) の説明書
- ☐ 優先権書類 (上記第VI欄の () の番号を記載する):
- ☐ 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する):
- ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
- ☐ スクレオチド及び/又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク)
- ☐ その他 (書類名を詳細に記載する):

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名: 日本語

IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
5. 出願人により特定された国際調査機関 ISA/JP	
6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月: 再版1999年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
 INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
 (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2576WOOP	FOR FURTHER ACTION		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP99/06873	International filing date (day/month/year) 08/12/1999	Priority date (day/month/year) 09/12/1998	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int. C1⁷ C12N15/19, C12P21/02, C07K14/52, A61K38/19			
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.			

1.	This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.																								
2.	This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.																								
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEAXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).																								
These annexes consist of a total of sheets.																									
3.	This report contains indications relating to the following items: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr><td style="width: 5%;">I</td><td style="width: 5%;"><input checked="" type="checkbox"/></td><td>Basis of the report</td></tr> <tr><td>II</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Priority</td></tr> <tr><td>III</td><td><input checked="" type="checkbox"/></td><td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td></tr> <tr><td>IV</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Lack of unity of invention</td></tr> <tr><td>V</td><td><input checked="" type="checkbox"/></td><td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td></tr> <tr><td>VI</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Certain documents cited</td></tr> <tr><td>VII</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Certain defects in the international application</td></tr> <tr><td>VIII</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Certain observations on the international application</td></tr> </table>	I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report	II	<input type="checkbox"/>	Priority	III	<input checked="" type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	IV	<input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention	V	<input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	VI	<input type="checkbox"/>	Certain documents cited	VII	<input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application	VIII	<input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application
I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report																							
II	<input type="checkbox"/>	Priority																							
III	<input checked="" type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																							
IV	<input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention																							
V	<input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																							
VI	<input type="checkbox"/>	Certain documents cited																							
VII	<input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application																							
VIII	<input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application																							

Date of submission of the demand 24/01/2000	Date of completion of this report 20/11/2000
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN	Authorized officer HIKICHI Susumu Telephone No. 03 3581 1101 3448

INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/JP99/06283

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial

applicability; citations and explanations supporting such statement

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application N . PCT/JP99/06873

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):

☒ **International Filing Document as originally filed**

Description, pages:

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Claims, No:

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Drawings No:

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Sequence Listing

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2c):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP99/06873

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The international search report has not been established in respect of certain claims with regard to novelty, inventive step or industrial applicability due to the following reasons.

- ☐ The entire International Application
- ☒ The range of Claim(s) 15

Reasons

- ☒ The International application or claim(s) 15 not required to be search by this authority, namely:

Invention as set forth in claim 15 pertains to methods for prevention or treatment of diabetes by administering a betacellulin mutein or its salt to mammals and substantially corresponds to methods for treatment of the human body by therapy. Therefore, it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17 (2) (a)(i) of the PCT and Rule 39.1 (iv) of the Regulations under the PCT, to search.

- ☐ Not giving a opinion due to unclear of mention at the range of a detailed statement, the range of claims or drawing (the following parts) or the range of claims(s) _____ by a detailed statement.
- ☐ Not giving a opinion due to being short of support for the range of the entire claims or the range of claims(s) by a detailed statement.
- ☒ The international search report has not been established in respoect of Claims(s) 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP99/06873

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-14,16
	No:	Claims	
Inventive Step (IS)	Yes:	Claims	1-14,16
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-14,16
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

See a separate sheet

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Reference 1: *Nippon Rinsho* (1993), Vol. 51, No. 12, pp. 3308-3317

Reference 2: *J. Biol. Chem.* 268 [25] (1993) pp. 18835-18843

Reference 3: *J. Cel. Physiol.* 163 [2] (1995) pp. 407-417

Claims 1 through 14, 16

The inventions described in Claims 1 through 14 and 16 lack inventive step, based on References 1 through 3 cited in the International Search Report.

Reference 1 describes base sequences of cDNA coding for mouse and human betacellulin, and the amino acid sequences inferred on their basis. It is stated that betacellulin precursors have structural characteristics quite similar to that of TGF- α , and that their action on the growth of HSC-1 cells is quite similar to that of EGF or TGF- α . In Reference 2, it is stated that the N terminal region of human amphiregulin (AR) has no effect on the EGF tyrosine kinase activity of AR. In Reference 3, it is stated that mutations of the conserved leucine present in the C terminal region of EGF and TGF- α reduce the affinity for EGF receptors.

Thus, based on Reference 3, it may be predicted that mutations of the conserved leucine present on the C terminal side could reduce EGF activity, and one having ordinary skill

THIS PAGE BLANK (USPTO)

in the art could therefore readily conceive of attempting to induce mutations in the leucine at 78 in mature betacellulin in order to obtain the betacellulin with lower EGF activity in the invention in Reference 1. One having ordinary skill in the art would readily understand that such a mutation could be brought about by deleting the C terminal up to the 78th position or deleting the vicinity around the leucine at 78. According to Reference 2, meanwhile, deletions of the N terminal region apparently have no effect on EGF activity, whereas it is stated in Reference 3 that the presence of the leucine has a completely opposite effect on the behavior of EGF activity in AR and HB-EGF. As such, one having ordinary skill in the art could easily surmise that, as opposed to the AR described in Reference 2, the deletion of the N terminal could reduce EGF activity, based on the fact that betacellulin has a conserved leucine as does HB-EGF. Accordingly, one having ordinary skill in the art would readily understand that a reduction in the EGF activity of betacellulin could be expected when attempting to delete the N terminal region of betacellulin. One having ordinary skill in the art would also readily understand that the resulting betacellulin with lower EGF activity could be used as a medicinal composition.

THIS PAGE BLANK (USPTO)